

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin III
Prof. Dr. Wolfgang Herr
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

***In vitro*-Charakterisierung stabiler muriner
Mausmelanom-Zelllinien mit short hairpin
RNA-Knockdown der LDHA**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marlene Hannah Koltzus

aus
München

im Jahr
2017

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

“LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells.” Almut Brand, Katrin Singer, Gudrun E. Koehl, Marlene Kolitzus, Marina Kreutz *et al.* (Cell Metabolism 24, 657-671, 2016)

Dekan

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Marina Kreutz

2. Berichterstatter:

PD Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Einführung in den Tumormetabolismus	7
1.2 Ansäuerung im Tumormilieu	8
1.3 Die Rolle von Laktat bei der Tumorprogression	8
1.4 Der Warburg-Effekt: Beispiele eines Phänomens, das viele Tumorentitäten verbindet	9
1.5 Die Regulation des Warburg-Effekts	11
1.6 Der reverse Warburg-Effekt und die Bedeutung der umliegenden Stromazellen	13
1.7 Der Warburg-Effekt in der Klinik	13
1.8 Der Warburg-Effekt als therapeutisches Target	14
1.9 Die Rolle der Hypoxie in der Tumorforschung	14
1.10 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Progression von Tumoren	15
2. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Antikörper für Western Blot	18
3.1.2 Antikörper für Durchflusszytometrie	18
3.1.3 RT-PCR Primer	18
3.1.4 Zelllinien	19
3.1.5 Software	20
3.1.6 Geräte	20
3.1.7 Verbrauchsmaterial und Kits	21
3.2 Methoden	23
3.2.1 Zellkultur	23
3.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
3.2.1.2 Medium und Selektionsantibiotika	23
3.2.1.3 Passage und Kultur der Zellen	23
3.2.1.4 Mykoplasmentest	24
3.2.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels PreSens Technologie	24
3.2.2.1 Funktionsprinzip	24
3.2.2.2 Vorbereitung der Zellen und Versuchsdurchführung	25
3.2.2.3 Zugabe von Interferon γ	25
3.2.3 Proliferation	26
3.2.3.1 Vorbereitung der Zellen	26
3.2.3.2 Messung der Proliferation	26

3.2.4 Laktat	26
3.2.4.1 Herstellung des Zellkulturüberstandes	26
3.2.4.2 Laktatbestimmung	27
3.2.5 Messung des Glukoseverbrauchs der Zellen	27
3.2.5.1 Vorbereitung der Zellen	27
3.2.5.2 Anwendung des Glukose Assay Kits	27
3.2.6 Durchflusszytometrie	28
3.2.6.1 Prinzip und Gerät	28
3.2.6.2 Vorbereiten und Färben der Zellen	28
3.2.7 Hypoxiebehandlungen	30
3.2.7.1 Hypoxieschrank	30
3.2.7.2 Chemische Hypoxie mit 2,2 Dipyridyl und Deferoxamin	30
3.2.7.2.1. Vorbereitung der Zellen	30
3.2.7.2.2. Abnahme der Überstände zur Laktatmessung	31
3.2.7.2.3. Abnehmen des Ansatzes für die Viabilitätsmessung .mittels CASY	31
3.2.7.2.4. Apoptosefärbung der Zellen unter chemischer Hypoxie	31
3.2.8 RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Chain-Reaction).....	32
3.2.8.1 Vorbereitung der Zellen	32
3.2.8.2 Herstellung der Lysate	32
3.2.8.3 Isolierung von RNA	33
3.2.8.4 Reverse Transkription	34
3.2.8.5 Vorbereitung der RT-PCR	35
3.2.8.6 Realplex	36
3.2.8.7 Auswertung	36
3.2.9 Western Blot	37
3.2.9.1 Prinzip	37
3.2.9.2 Vorbereitung der Zellen	37
3.2.9.3 Herstellung der Proteinlysate	38
3.2.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate	38
3.2.9.5 Gießen der Gele	39
3.2.9.6 Vorbereitung der Proben	40
3.2.9.7 SDS-Gelelektrophorese	40
3.2.9.8 Western Blot	41
3.2.9.9 Immundetektion	41
3.2.10 Statistische Auswertungen	43
4. Ergebnisse	44
4.1 Nachweis der LDHA	44

4.1.1 Nachweis der LDHA mittels RT-PCR	44
4.1.2 Expression der LDHA auf Proteinebene	45
4.1.3 Reduzierte Laktatproduktion bei Lac ^{lo} -Klonen im Vergleich zu Lac ^{hi} -Klonen	46
4.2 Charakterisierung von Wachstum, Stoffwechsel und Oberflächenexpression	46
4.2.1 Glukoseverbrauch	47
4.2.2 Proliferationsverhalten von Lac ^{hi} und Lac ^{lo} -Klonen	48
4.2.3 Wachstum in Zellkultur von Lac ^{hi} - und Lac ^{lo} -Klonen im Vergleich	49
4.2.4 Einfluss des Knockdowns der LDHA auf den Sauerstoffverbrauch.....	52
4.2.5 Messung weiterer Stoffwechselfparameter auf Protein- und mRNA-Ebene	54
4.2.6 Durchflusszytometrische Messung bestimmter Oberflächenmarker	56
4.3 Einfluss des Tumormilieus	60
4.3.1 Verhalten der Klone unter Hypoxie	60
4.3.1.1 Hypoxieschrank	60
4.3.1.2 Chemische Hypoxie	62
4.3.2 Effekt von 20 ng/ml IFN- γ	68
4.3.2.1 Proliferation	68
4.3.2.2 Laktat	68
4.3.2.3 Sauerstoffverbrauch	69
4.3.2.4 Oberflächenexpression	70
5. Diskussion	75
5.1 LDHA und LDHB-Expression von Lac ^{hi} und Lac ^{lo} -Klonen	75
5.2. Einfluss der LDHA-Expression auf das Wachstum und den Metabolismus der Tumorzellen	76
5.2.1 Proliferation und Sauerstoffverbrauch	76
5.2.2 Glukoseverbrauch	78
5.3 Einfluss der veränderten LDHA Expression auf Oberflächenexpression.....	78
5.4 Einfluss von Hypoxie auf Lac ^{hi} - und Lac ^{lo} -Klone	79
6. Zusammenfassung und Ausblick	81
7. Abkürzungsverzeichnis	82
8. Quellenverzeichnis	84
9. Danksagung	90
10. Eidesstattliche Erklärung	91

1. Einleitung

1.1 Einführung in den Tumormetabolismus

Tumorzellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von gesunden, nicht entarteten Zellen des Körpers. In den vergangenen Jahrzehnten wurden viele Mechanismen untersucht, die eine Zelle zur Krebszelle machen und die maligne Entartung unterstützen. Diese „Meilensteine der Krebsentstehung“ werden nach Hanahan und Weinberg „Hallmarks of Cancer: the Next Generation“ [1] (*engl.*: „Meilensteine der Krebsentstehung: die nächste Generation“) folgendermaßen benannt: dauerhafte Proliferation, fehlende Reaktion auf wachstumshemmende Signale, fehlerhafte Apoptose und Nekrose, Unsterblichkeit durch unendliche Replikation, Induktion von Angiogenese sowie die Initiation von Invasivität und Metastasierung. Gemäß dem Titelzusatz „The next generation“ (*engl.*: „Die nächste Generation“) wird klar, dass die Forschung inzwischen zwei weitere „Meilensteine“ der Krebsentstehung definiert hat: Zu einer Tumorzelle gehören sowohl eine Änderung der Stoffwechselvorgänge als auch die Fähigkeit, sich der Eliminierung durch körpereigene Immunzellen zu entziehen. Letzteres wird mit dem in der immunologischen Forschung etablierten Begriff „immune escape“ (*engl.*: Immunevasion) beschrieben. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte Otto Warburg, dass am Anfang der Tumorgenese ein veränderter Stoffwechsel liegt [2]. Während seiner Laufbahn untersuchte er beispielsweise Krebszellen aus Aszites und postulierte einen veränderten Sauerstoffverbrauch, eine Störung der Mitochondrien, gesteigerte aerobe Glykolyse, das heißt Glykolyse trotz ausreichenden Sauerstoffangebots und einen erhöhten Glukoseverbrauch. Saga *et al.* [3] konnten am Beispiel des Glioms nachweisen, dass die Tumor-initiierenden Zellen bereits einen Warburg Phänotyp im Sinne einer erhöhten Expression glykolytischer Enzyme aufwiesen; auch eine Klonierung und Subklonierung sowie eine Reimplantation änderten an diesem Phänotyp nichts. Dies unterstreicht die Stabilität und Bedeutung des Warburg Phänotyps.

Neben diesem sogenannten „Warburg-Effekt“ existieren noch viele weitere Stoffwechselwege, in denen sich Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden können; hierzu zählen z.B. verstärkte anabole Stoffwechselvorgänge, die der Bereitstellung von Bausteinen für die Synthese von Lipiden, Proteinen und DNA (*engl.*: deoxyribonucleic acid) dienen. Auch eine verstärkte Glutaminolyse wurde nachgewiesen; sie trägt zur Aufrechterhaltung der Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien und zur Bereitstellung wichtiger Bausteine der Lipidsynthese bei [4]. Zusätzlich zu der

Versorgung mit ATP spielt auch die Bereitstellung von Metaboliten und Bausteinen für die Tochterzellen eine wichtige Rolle für das Tumorstadium [5].

Weiterhin konnte die konstitutive Expression der Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) in vielen Tumoren nachgewiesen werden. IDO verändert auf unterschiedliche Arten die durch T-Zellen vermittelte Immunantwort auf das Tumorgeschehen, beispielsweise durch die Reduktion des für die T-Zellen wichtigen Tryptophans [6]. Die verstärkte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase, kurz „iNOS“ (*engl.* inducible nitric oxide synthetase) bei Tumorzellen steht im Zusammenhang mit Stickstoffmonoxid-Produktion und so mit Angiogenese, Metastasierung und Immunsuppression [7].

Das Enzym Arginase (ARG), welches Arginin in Ornithin und Harnstoff umwandelt, wurde ebenso in der Tumorummunologie untersucht. Die Immunzellpopulation der „myeloid derived suppressor cells“, kurz MDSC's (*engl.*: Myeloid derived suppressor cells, *deutsch*: „Myeloide Suppressorzellen“) führen zu einer Verknappung von Arginin und zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung [8]. Arginase_1 (ARG1) wird durch die Cyclooxygenase_2 (COX2) reguliert; eine Blockade der COX2 kann experimentell zu einem Wiederanstieg tumorinfiltrierender Lymphozyten führen. Die erwähnte COX2 ist ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels und kommt sowohl in entzündeten Geweben als auch in Tumorzellen vor. Die pharmakologische Hemmung der Cyclooxygenase kann beispielsweise experimentell die MDSC-Ausbreitung in Tumoren verringern [9].

1.2 Ansäuerung im Tumormilieu

Bei der aeroben Glykolyse in Tumoren produzieren die Zellen weniger ATP pro Mengeneinheit Glukose, als es mit oxidativer Phosphorylierung möglich wäre. Was sind mögliche Erklärungen für die Hochregulation dieses scheinbar ineffizienten Stoffwechselweges? Durch die verstärkte Glykolyse entsteht Laktat, das im Kotransport mit Protonen aus der Zelle transportiert wird. Hierdurch kommt es zur Ansäuerung des Extrazellularraumes. Die Hochregulation glykolytischer Enzyme und entsprechender Transporter führt zu einer Herabsetzung des pH im Extrazellularraum, zu einer Aktivierung von lysosmalen Enzymen und zur Begünstigung der Metastasierung. Somit begünstigt Laktat auf verschiedene Weise die Tumorstadien [10].

1.3 Die Rolle von Laktat bei der Tumorstadien

Der Warburg Phänotyp der Tumorzellen geht mit einer erhöhten Produktion von Laktat einher [11]. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein tetrameres Enzym, das aus LDHA- und

LDHB-Untereinheiten besteht. Vier Untereinheiten LDHA bilden die LDH5, welche bevorzugt Pyruvat zu Laktat reduziert. Vier Untereinheiten LDHB bilden die LDH1, die bevorzugt die Rückreaktion, also Pyruvat aus Laktat produziert. LDH2-4 enthalten unterschiedlich viele Anteile LDHA und LDHB.

Wie Hirschhauser *et al.* in ihrem Review von 2011 zusammenfassen, spielt Laktat eine Schlüsselrolle im Tumormetabolismus [11]. Es konnte gezeigt werden, dass Laktat trotz der Anwesenheit von Sauerstoff produziert wird, dass also eine erhöhte Konzentration von Laktat im Tumor nicht zwangsläufig ein Hinweis auf Hypoxie ist. Die Höhe des Laktatspiegels im Tumor ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose und höherer Metastasierungsrate beispielsweise beim humanen Zervixkarzinom [12]. Es wurde gezeigt, dass Laktat im Tumor die umgebenden Zellen des Tumorstromas wie z.B. die Fibroblasten zur Produktion von Hyaluronsäure anregt und durch Stimulation der Angiogenese und Migration eine Metastasierung begünstigt [11]. Auch bei der Wundheilung spielt Laktat eine Rolle, indem es die Angiogenese stimuliert [13,14]. Ausserdem ist eine höhere Laktatproduktion mit einer erhöhten Strahlenresistenz von manchen Tumorentitäten assoziiert [12,15].

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde versucht, die LDHA experimentell auszuschalten: Dies geschah entweder durch „small interfering RNA“ (siRNA) oder durch den chemischen, kompetitiven und reversiblen LDHA-spezifischen Inhibitor FX11. Man konnte in beiden Fällen beobachten, dass die ATP-Levels der Zellen absanken und es verstärkt zur Apoptose kam [16]. Somit scheinen die Glykolyse bzw. die Aktivität der LDHA wichtig für das Überleben von Tumorzellen zu sein.

Dass eine exzessiv hohe Laktatproduktion jedoch auch bei Tumorzellen die Proliferation inhibiert oder den Zelltod bedeuten kann, beschreiben Kroemer *et al.* in ihrem Review zum Tumorzellmetabolismus [17].

Man kann also zusammenfassen, dass Tumorzellen viel Glukose verbrauchen, gleichzeitig viel Laktat produzieren und dass dies wichtig für die Proliferation ist und zur Aggressivität des Tumors beiträgt.

1.4 Der Warburg-Effekt: Beispiele eines Phänomens, das viele Tumorentitäten verbindet

Eine erhöhte Expression von LDH5 in Biospien von verschiedenen Hauttumoren war in einer Arbeit von Zhuang *et al.* assoziiert mit einem Progress der Tumorerkrankung bei den Patienten [18]. Eine hohe Expression der LDHA gilt als aussagekräftiger negativer prognostischer Marker beim klarzelligen Nierenzellkarzinom [19]. Eine umfangreiche

Analyse des Metaboloms von Osteosarkomzellen zeigte eine signifikant erhöhte Konzentration von Laktat und Pyruvat im Vergleich zu osteoblastischen Zellen [20]. Hohe Konzentrationen an Laktat in Primärtumoren korrelieren beim Zervixkarzinom und bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches mit einer kürzeren Gesamtüberlebensdauer der Patienten [21]. Beim Prostatakarzinom ergab eine Studie mit 83 Patienten, dass die Überexpression von LDH5 im entnommenen Tumorresektat mit einer Resistenz gegenüber einer Bestrahlung einhergeht [22]. In einem Zellkulturmodell mit einer bestrahlungsresistenten Zelllinie eines ösophagealen Adenokarzinoms wurden eine mitochondriale Dysfunktion sowie eine erhöhte Plastizität des Energiestoffwechsels nachgewiesen. Die Zellen konnten zwischen oxidativer Phosphorylierung und erhöhter Glykolyse wechseln [23]. Für das Pankreaskarzinom wurde nachgewiesen, dass eine Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein M1 (FOXO1) die LDHA aktiviert und zur Tumorprogression beiträgt [24]. Bei einem *in vivo*-Modell mit murinen Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen, welche einem Knockdown der LDHA unterzogen wurden, eine verzögerte Metastasierung und ein langsames Wachstum des Primärtumors im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen [25]. Zhou *et al.* analysierten in einer retrospektiven Studie den Zusammenhang zwischen der Expression von LDHA, Hexokinase_2 (HK2), Glukosetransporter_1 (Glut-1) und der Glukoseaufnahme in Positronenemissionstomographie-Untersuchungen von Patienten mit einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. Eine erhöhte LDHA-Expression war mit einer erhöhten Glukoseaufnahme im PET assoziiert [26]. In einer weiteren Arbeit wurde beim Magenkarzinom immunhistochemisch nachgewiesen, dass eine erhöhte Expression von LDHA und Smad interacting Protein1 (SIP1), welches eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielt, mit einem niedrigeren Gesamtüberleben und niedrigerem tumorfreien Überleben assoziiert war [27]. Bei Weichteilsarkomen wurde nachgewiesen, dass eine schlechte Prognose mit der Expression der Monocarboxylattransporter MCT1 und 4 assoziiert ist, nicht jedoch mit MCT2 [28]. Interessanterweise spielt hierbei die Lokalisation der Monocarboxylattransporter eine entscheidende Rolle. Nur die erhöhte Konzentration in der Plasmamembran war mit einer schlechten Prognose assoziiert, während die nukleäre MCT1-Expression eher mit weniger aggressivem Wachstumsverhalten assoziiert war. Eine erhöhte Expression von MCT1, MCT4 und ihrem Chaperon CD147 (CD *engl.*: „cluster of differentiation“) konnte auch im Urothelkarzinom mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht werden [29]. Neben den Enzymen der Glykolyse wurden zusammenfassend in einer experimentellen Arbeit auch andere Parameter des Stoffwechsels

massenspektrometrisch untersucht: Diese Parameter wurden in zahlreichen verschiedensten immortalisierten Tumorzelllinien und als Vergleichsgruppe in nicht entarteten Zellen desselben Gewebetyps untersucht. In Leberzellkarzinomzellen wurde beispielsweise eine erhöhte Konzentration an extrazellulärem Arginin und Nicotinamid gefunden [30]. Auch im Verbrauch von Di- und Tripeptiden unterschieden sich die Tumorzelllinien von den nicht entarteten Zellen. In allen untersuchten Tumorzellarten (u.a. Leukämien, Melanom, Hepatozelluläres Karzinom, Urothelkarzinom, Mammakarzinom, Kolorektales Karzinom) wurde eine erhöhte Laktatproduktion nachgewiesen [30]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Warburg Phänotyp bei vielen unterschiedlichen Tumorarten vorkommt und somit eine Gemeinsamkeit vieler Entitäten bildet, die sich sonst in Vorkommen, Prognose und Risikofaktoren stark voneinander unterscheiden.

1.5 Die Regulation des Warburg-Effekts

Die Expression des Onkogens myc, welches bei circa 30% der humanen Tumore gefunden wird, kann in Zusammenhang mit der Hochregulation glykolytischer Enzyme gebracht werden. Myc fördert die Stabilisierung des „Hypoxie induzierten Faktors 1 α “ (HIF1 α) [31]. Dieses suggeriert eine sauerstoffarme Umgebung und führt ebenfalls zur Hochregulation vieler glykolytischer Enzyme und Glykolyse-assoziiierter Transporter und Enzyme wie z.B. Glut-1 und LDH [32]. Myc, ein Onkogen, codiert den Transkriptionsfaktor „c-myc“, welcher die Synthese von Ribosomen, Mitochondrien, glykolytischen Enzymen und die Glutaminolyse reguliert. Besonders unter hypoxischen Bedingungen induzieren Myc und HIF1 die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1), welche die Oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien supprimiert und so die Bildung von Laktat aus Glukose fördert [33]. Dass eine mitochondriale Störung mitursächlich in der Kanzerogenese ist, beschreiben Seyfried *et al.* [34]. Eine Rolle spielt auch der Transkriptionsfaktor FOXM1. FOXM1 ist in murinen pankreatischen Tumorzellen für die Hochregulation von LDHA und der ebenfalls in der Glykolyse bedeutenden Phosphoglyceratkinase1 (PGK1) verantwortlich. Auf welche Weise FOXM1 wiederum hochreguliert wird, ist ungeklärt [24].

Beim Vergleich von eutopem Endometrium und Endometriosezellen bezüglich des “Transforming Growth Factor β “ (TGF β) und Laktat wurde gezeigt, dass Endometriosezellen auch einen Warburg Phänotyp mit erhöhtem Laktat aufweisen [35]. Die Behandlung von Mesothelzellen mit TGF β führte zu einer Steigerung glykolytischer Enzyme und von HIF1 α , welches ebenso wie c-myc an der Regulation der LDHA in entscheidender Weise beteiligt ist

[35]. Dies unterstützt die These einer bedeutenden Rolle von TGF β in der Entstehung des Warburg Phänotyps.

Bensinger *et al.* messen in ihrem Review neben der Bedeutung des Warburg-Effektes für die PET auch der aktuell stattfindenden Erforschung des Von-Hippel-Lindau-Gens (VHL) sowie HIF1 α , p53, PyruvatkinaseM2 (PKM2), IDO und LDH eine große Bedeutung bei [36]: Die PKM2 ist in sich teilenden Zellen wie beispielsweise humanen Stammzellen nachgewiesen worden und führt über eine erhöhte Glykolyserate auch zum Auftreten eines Warburg Phänotyps. VHL ist ein Tumorsuppressorgen, welches über einen ubiquitinvermittelten Abbau von HIF1 α eng im Zusammenhang mit der Kontrolle der Glykolyse steht [37].

Ein weiterer Aspekt, der bei der Erforschung des Warburg-Effekts berücksichtigt werden muss, ist, dass die „Warburg-relevanten“ Enzyme wie LDHA, Pyruvatkinase oder Hexokinase durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen in ihrer Aktivität beeinflusst werden [38].

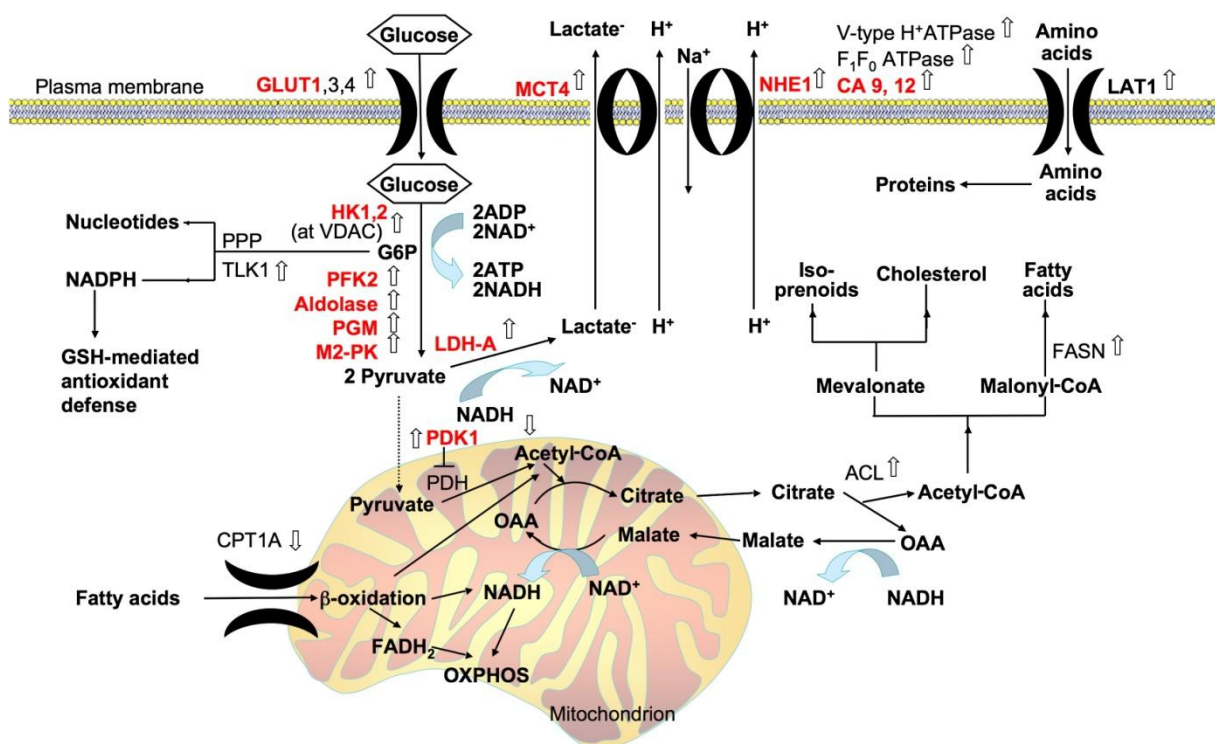


Abb. 1.1 Veränderte Stoffwechselwege in der Tumorzelle Gezeigt ist eine Zusammenfassung verschiedener Stoffwechselwege, welche in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen verändert sind. In der normalen Zelle findet ein Teil des Glukoseabbaus in den Mitochondrien mittels oxidativer Phosphorylierung statt. In Tumorzellen findet stattdessen eine vermehrte Umwandlung von Pyruvat in Laktat statt, zudem wird aus diesem vermehrt Acetyl-CoA bereitgestellt, welches für die Synthese von Zellbausteinen wie z.B. Lipiden verwendet wird. Die mit Pfeilen markierten Enzyme sind in Tumorzellen hochreguliert und unterstützen damit den „Warburg Phänotyp“ [16].

1.6 Der reverse Warburg-Effekt und die Bedeutung der umliegenden Stromazellen

Pavlidis *et al.* postulieren als den sogenannten „reversen Warburg-Effekt“, dass Tumorzellen umliegende Stromazellen in ihrem Stoffwechsel so beeinflussen können, dass diese einen Warburg Phänotyp zeigen und somit ein energiereiches Milieu für die Tumorzellen zur Verfügung stellen [39,40]. Dieses Milieu soll Migration und Angiogenese fördern. Monocarboxylattransporter werden sowohl auf Tumorzellen als auch in umliegenden Tumorstromazellen exprimiert. Beim Prostatakarzinom wurden der Monocarboxylattransporter MCT4 und der Hypoxiemarker Carboanhydrase_9 auf Fibroblasten detektiert. Beim untersuchten Patientenmaterial nach radikaler Prostatektomie liegt also gemäß der Auffassung der Autoren ein sogenannter „reverser Warburg-Effekt“ vor [41]. Es ist inzwischen unbestritten, dass die umliegenden Zellen einen wichtigen Beitrag zur Tumorgenese leisten. Welchen Stellenwert die umliegenden Stromazellen bei Tumoren speziell mit hoher Laktatproduktion haben, muss noch weiter untersucht werden.

1.7 Der Warburg-Effekt in der Klinik

Die Fluor-Deoxy-Glukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) ist aus dem klinischen Alltag bei der Diagnose einer Vielzahl von Tumoren nicht mehr wegzudenken. Im weitesten Sinne handelt es sich bei dieser nuklearmedizinischen Untersuchung um ein bildgebendes Verfahren zur Abbildung von erhöhter Glukoseverstoffwechselung in Tumorgewebe. Die FDG-PET stellt derzeit eine der wichtigsten Anwendungen des Warburg-Effekts in der Klinik dar [36]. Dieses Verfahren kann jedoch nicht gut zwischen Tumor und Entzündung unterscheiden. Ursache hierfür ist, dass in entzündetem Gewebe auch viel Glukose verstoffwechselt wird: Der Shift von oxidativer Phosphorylierung hin zur aeroben Glykolyse ist demnach nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Entzündungszellen bekannt. Nachgewiesen ist dies für Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen [42]. Von Bedeutung in der Klinik ist auch der Warburg-Effekt bei der Radioresistenz von Tumoren. Erhöhte Laktatkonzentrationen gingen in einem Xenograftmodell mit erhöhter Resistenz gegenüber Radiotherapie einher [15].

1.8 Der Warburg-Effekt als therapeutisches Target

Seit langem wird experimentell versucht, den Warburg-Effekt therapeutisch zu nutzen. Verschiedene Agenzien sind hierzu in der Erprobung. Inhibitoren der Schlüsselenzyme der Glykolyse wie der Hexokinase, der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase sind in Zellkulturen und teilweise auch im Tierversuch getestet worden [43,44]. 2-Deoxyglukose (2-DG) inhibiert die Produktion von Glukose-6-Phosphat, akkumuliert in der Zelle und führt zu einem Stop der ATP-Produktion. Seine Effektivität wurde in Kombination mit einer Bestrahlung gesteigert und beim Osteosarkom und beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom unter Beweis gestellt [43]. Lonidamin, ein Inhibitor der Hexokinase II, zeigte eine effektive antiproliferative Wirkung bei diversen Tumorzelllinien; die Phase II-Studie am Patienten, die sich aufgrund benigner Prostatahyperplasie mit Lonidamin behandeln ließen, musste jedoch wegen Lebertoxizität abgebrochen werden [43]. 3-Brompyruvat ist ebenfalls ein Hexokinaseinhibitor und befindet sich wie Lonidamin in frühen Phasen klinischer Studien [43]. Ein potenter Inhibitor der LDHA ist Dihydroxynaphthoinsäure [43]. Gemeinsam mit Oxamat, ebenfalls einem LDH-Inhibitor, konnte bei paclitaxelresistenten Fällen von Mammakarzinom eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Auch Dichloracetat, bekannt aus der Behandlung der Laktatazidose sollte im Zusammenhang mit Tumoren, welche viel Laktat produzieren, auf seine Wirkung untersucht werden: Im Zellkulturmodell mit oralen Plattenepithelkarzinomlinien konnte eine Apoptoseinduktion bzw. ein Proliferationsstop beobachtet werden [45].

Allison *et al.* postulieren, dass bei der Inhibition von LDHA ein Überleben der Zelle nur mit einem intakten p53 möglich ist. Aus dieser Tatsache leiten die Autoren eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention ab: p53, einer der bekanntesten Tumorsuppressoren ist schätzungsweise in 50% der Tumore mutiert. Eine Mutation führt über diverse Zwischenschritte zu einer verminderten Apoptose der Tumorzelle, unter anderem über ein von p53 abhängiges Verhältnis der Nicotinamidadenindinukleotidformen NADH/NAD⁺ und über bestimmte zelleigene Moleküle, die die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber oxidativem Stress, zum Beispiel bei einer Inhibition der LDHA erhöhen und somit dem Apoptoseescape entgegenwirken [46].

1.9 Die Rolle der Hypoxie in der Tumorforschung

Solide Tumore weisen in bis zu 50% der Fälle hypoxische Areale auf [47]. Zusammenfassend muss das Auftreten von Hypoxie wegen der Schwierigkeit der intratumoralen Sauerstoffmessung durch andere Surrogatparameter wie HIF1 α ,

Carboanhydrase_9 oder der Nutzung spezieller radioaktiver Substanzen verifiziert werden [48]. Die Größe des Tumors, „Staging“, „Grading“ und histologischer Typ sind allerdings keine Prädiktoren für das Auftreten von Hypoxie. Hypoxie bedeutet oxidativen Stress, Proliferationsstop, Apoptose und Nekrose der Zellen. In diesem hypoxischen Milieu werden Faktoren in den Tumorzellen aktiv, die Metastasierung und Angiogenese fördern; letzteres ermöglicht den Zellen, das ungünstige Milieu zu verlassen. Dies ist gleichbedeutend mit der Entstehung eines klinisch aggressiveren Phänotyps. Es stehen verschiedene radioaktive Substanzen zur Verfügung, mit denen man per PET-Computertomographie (PET-CT) Hypoxie nuklearmedizinisch nachweisen kann, z.B. ^{18}F -Fluoromisonidazol oder ^{18}F -Fluoroetanidazol. Hierbei konnte eine Korrelation von Hypoxie und Prognose nachgewiesen werden: Mehreren Studien zufolge erlitten Patienten mit Tumorphypoxie früher einen Rückfall und zeigten ein schnelleres Tumorwachstum. Die Studienlage zu diesem Sachverhalt ist allerdings nicht eindeutig [47].

In Tumoren werden erhöhte Konzentrationen des Hypoxie-induzierenden Faktors HIF gemessen, da durch die Hypoxie HIF weniger ubiquitinvermittelt abgebaut wird. Der HIF1 α /HIF1 β -Komplex aktiviert die Transkription von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse [49].

Neben HIF1 α und myc zählt auch p53 zu den wichtigen Wachstumsfaktoren zur Regulation des Zellstoffwechsels. Eine experimentelle Arbeit von 2014 konnte zeigen, dass das Überleben von Tumorzellen in Zellkultur unter Hypoxie oder hypoxieähnlichen Bedingungen vom Vorhandensein von p53 abhängig sein kann [50].

Durch die Inhibition von MCT1 durch alpha-cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) oder siRNA konnten Tumorzellen experimentell zur Apoptose gezwungen werden [51]: Am Anfang dieser Kausalkette stand die Produktion von Laktat durch hypoxische Tumorzellen; das Laktat diffundiert in die Umgebung und wird in umliegende Tumorzellen durch MCT1 aufgenommen. Durch die Hemmung desselben ändert die Zelle ihren Stoffwechsel wieder mehr hin zur oxidativen Phosphorylierung; unter hypoxischen Bedingungen fehlt jedoch die Grundlage zur Energiegewinnung, was im Zelltod endet.

1.10 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Progression von Tumoren

Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung wurde in letzter Zeit intensiv erforscht: Bei vielen Tumoren wie z.B. dem Mamma- oder dem Kolonkarzinom wurden weniger Rezidive, langsamere Tumorprogression und längeres Gesamtüberleben

nachgewiesen, wenn diese Tumore von zytotoxischen T-Zellen infiltriert waren [52,53]. Doch nicht nur die Anzahl, sondern auch die Aktivität der Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TILs) spielt dabei eine entscheidende Rolle. Häufig sind die TILs anerg [54]. Gegenstand intensiver Forschung ist die Lymphozytensubpopulation der regulatorischen T-Zellen, der „Tregs“. Sie vermitteln u.a. die Suppression einer Tumorantigen-spezifischen Abwehrreaktion [55]. Eine weitere Subpopulation, die zur Tumorentstehung bzw. zum Tumorprogress beiträgt, sind die „Myeloiden Suppressorzellen“. Ihr Auftreten wird oft in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose gebracht [56,57]. Die Anergie der anti-tumoralen Lymphozyten kann mehrere Ursachen haben: zum einen können sie von MDSC oder Tregs unterdrückt werden, zum anderen könnten von Tumorzellen stammende Metabolite dafür verantwortlich sein. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die TNF-Sekretion von humanen Monozyten bereits durch geringe Konzentrationen an Laktat (<10mM) herabgesetzt wird [58]. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass humane zytotoxische T-Zellen in Proliferation und zytotoxischer Aktivität durch Laktat gehemmt werden [52]. Weiterhin werden auch dendritische Zellen durch Laktat beeinflusst: Monozyten differenzieren in Versuchen mit Tumorsphäroiden in tumorassoziierte dendritische Zellen und ändern im Beisein von Laktat ihr Differenzierungsmuster und ihre Zytokinproduktion [53]. In der Effektorphase von zytotoxischen T-Zellen wird unter dem Einfluss von Laktat die Zytokinproduktion und die Sekretion zytolytischer Granula gehemmt [59]. Zudem wurde nachgewiesen, dass Laktat *in vitro* die Migration und Zytokinsekretion von Monozyten inhibiert [60]. Im *in vivo* Modell wurde eine Störung der T-Zellfunktion für das Nierenzellkarzinom nachgewiesen [61].

2. Zielsetzung

Der Warburg-Effekt, d.h. eine gesteigerte Glykolyse und eine zusammenhängende starke Laktatproduktion, ist charakteristisch für viele Tumore. Um den Einfluss von Laktat auf Immunzellen *in vitro* zu untersuchen wurden in Vorarbeiten B16 Mausmelanomzellen mit verminderter Laktatproduktion mittels „short-hairpin“ Technologie generiert. Ziel dieser Arbeit war es, als Grundlage für weitere *in vivo* Experimente in der Maus verschiedene Klone bezüglich diverser metabolischer Parameter *in vitro* zu charakterisieren. Nur sh-Kontroll-Klone bzw. shLDHA-Klone, die sich in wichtigen Kriterien wie Proliferation und Oberflächenexpression nicht wesentlich unterscheiden, können für solche Experimente *in vivo* eingesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Antikörper für Western Blot

<u>Spezifität</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Firma</u>	<u>Ort</u>
anti- β -Actin (<i>Mensch, Ratte, Maus</i>)	Kaninchen	IgG	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
anti-LDHA (<i>Mensch, Maus, Ratte, Affe</i>)	Kaninchen	IgG	Cell Signalling	Frankfurt a.M., Deutschland
anti-Phospho LDHA (<i>Mensch, Maus, Ratte</i>)	Kaninchen	IgG	Cell Signalling	Frankfurt a.M., Deutschland
anti-LDHB (<i>Mensch</i>)	Maus	IgG	Santa Cruz	Heidelberg, Deutschland
anti-Glut-1 (<i>Maus, Ratte, Mensch</i>)	Kaninchen	IgG	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-IgG, HRP-konj. (<i>Kaninchen</i>)	Ziege	IgG	Dako	Glostrup, Dänemark
anti-IgG, HRP-konj. (<i>Maus</i>)	Kaninchen	IgG	Dako	Glostrup, Dänemark

3.1.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

<u>Beschreibung</u>	<u>Firma</u>	<u>Ort</u>
PE Mouse Anti-Mouse H-2Kb	BD Biosciences	San Diego, USA
PE Mouse IgG2a, Mouse, κ Isotype Control	BD Bioscience	San Diego, USA
Brilliant Violet 421 anti mouse PD-L1	BioLegend	San Diego, USA
Brilliant Violet IgG2b, κ isotype ctrl	BioLegend	San Diego, USA
APC anti-mouse Iab	BioLegend	San Diego, USA
APC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl	BioLegend	San Diego, USA
Anti-Human/Mouse CD44 PerCP-Cyanine5.5	eBiosciences	San Diego, USA
IgG 2b Rat Isotype ctrl PerCP-Cyanine5.5	eBiosciences	San Diego, USA
Anti Mouse/Rat Ki-67 Alexa Flour 647	eBioscience	San Diego, USA
Alexa Fluor 647 Conjugated Rat IgG 2a Isotype ctrl	eBioscience	San Diego, USA

3.1.3 RT-PCR Primer

<u>Beschreibung</u>	<u>Gen</u>		<u>Sequenz 5'-3'</u>
18 S rRNA	<i>RN18S1</i>	forward	ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG
		reverse	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
Laktatdehydrogenase A	<i>Ldha</i>	forward	TATCTTAATGAAGGACTTGCGGATGAG
		reverse	GGAGTTCGCAGTTACACAGTAGTC
Laktatdehydrogenase B	<i>Ldhb</i>	forward	TTGTGGCCGATAAAGATTACTCTGTGAC
		reverse	AGGAATGATGAACCTTGAACACGTTGAC
Hexokinase 1	<i>Hk1</i>	forward	GACGACATCAGAACAGACTTCGAC
		reverse	CAATCAGGATGTTACGGACGATCTC

Hexokinase 2	<i>Hk2</i>	forward	GTGGACTGGACAACCTCAAAGTGAC
		reverse	GAAGGACACGTACATTTTCGGAG
Glukosetransporter 1	<i>Glut-1</i>	forward	CGTCCTGCTGCTATTGCTGTG
		reverse	GGTGAAGATGAAGAAGAGCACGAGG
Indolamin-2,3-Dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	forward	TCTCTATTGGTGGAAATCGCAGCTTCTC
		reverse	TCCAATGCTTTCAGGTCTTGACGCTC
Indolamin-2,3-Dioxygenase 2	<i>Ido1</i>	forward	TGCTGCCAAGATCTCTTGCCATTCC
		reverse	ACTGCTGCCTTCTCCACCAAGAC
Arginase 1	<i>Arg1</i>	forward	GACTCCCTGCATATCTGCCAAAGAC
		reverse	GTCTCTTCCATCACCTTGCCAATCC
Arginase 2	<i>Arg2</i>	forward	TGCATTTGACCCTAAACTGGCTCC
		reverse	ATTGACTTCAACAAGATCCAGAGCTGAC
Cyclooxygenase 1	<i>Cox1</i>	forward	CGCCTACAGCCCTTCAATGAATACC
		reverse	CCAACTCAGCAGCCATCTCCTTCTC
Cyclooxygenase 2	<i>Cox2</i>	forward	CAATGAGTACCGCAAACGCTTCTCC
		reverse	TGTCACTGTAGAGGGCTTTCAATTCTG
Monocarboxylattransporter 1	<i>Mcp1</i>	forward	ACTCACCTGCTGCTACTCATTACCC
		reverse	TGTAGGTTCTGATCTCATTTGGTTCCGA
Tumornekrosefaktor- α	<i>Tnf</i>	forward	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
		reverse	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
Transforming growth factor β 1	<i>Tgfβ1</i>	forward	CACCGGAGAGCCCTGGATA
		reverse	TGTACAGCTGCCGCACACA
Interleukin 10	<i>Il10</i>	forward	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
		reverse	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT

3.1.4 Zelllinien

Die Klone der Zelllinie B16.SIY E12 stammen von Melanomzellen aus der Haut von der Maus (Mus Musculus) und enthielten das „SIY-Plasmid“ mit G418 sowie ein Plasmid mit Blasticidinresistenz und shLDHA oder scrambled RNA. Die Klone wurden mit SIY-Plasmid und shLDHA bzw. scrambled LDHA kotransfiziert und 10:1 selektioniert. Verwendet wurden die Klone:

- Wildtyp (WT)
 - Lac^{hi}-Klone mit scrambled RNA: n.k. a/g, n.k. a/g I, n.k. a/g 2
 - Lac^{lo}-Klone mit shRNA: 2 l/b, 2 l/c, 2 l/c. 5
-

3.1.5 Software

<u>Software</u>	<u>Quelle</u>
Citavi 4	http://www.citavi.de/de
Graphpad Prism 5	http://www.graphpad.com/prism
Microsoft Office 2007	http://www.microsoft.com
OpenOffice 4.0.1	http://www.openoffice.org
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
FlowJo	http://www.flowjo.com/

3.1.6 Geräte

<u>Beschreibung</u>	<u>Firma, Ort</u>
Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Brutschrank Heraeus BBD 6220	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
CASY Zellzählsystem	CASY Innovatis, Roche, Mannheim, Deutschland
Elektrophorese-Apparaturen	Biometra, Göttingen, Deutschland
Entwicklermaschine Western Blot Curix 60	Afga, Mortsel, Belgien
Eppendorf Realplex 4 Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Evos Mikroskop	AMG Advances Microscopy Group, Seattle, USA
Hypoxieschrank New Brunswick Galaxy 14 S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
NanoDrop	PeqLab, Erlangen, Deutschland
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ-Research/Biometra, Oldendorf, Deutschland
Perkin Cell Harvester	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Perkin Lumineszenzdetektor	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Perkin Scintillation Harvester	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Picofuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
PTC-200 PeltierThermo Cycler	MJ Research Sercive Bio Rad Service, CA, USA
SDR SensorDish® Reader	PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Instudies Inc., New York, USA
Vortex Genie2	Scientific Industries
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Eschborn, Deutschland
Western Blot-Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Sartorius2-6 Sigma

3.1.7 Verbrauchsmaterial und Kits

Beschreibung	Hersteller, Ort
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Aqua	B. Braun, Melsungen, Deutschland
CompBeads Antimouse Ig k negative control compensation particle set	BD Biosciences, Basel, Schweiz
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumine 50 mg/ml	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Complete Mini Protease inhibitor Cocktail tablets	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Corning Costar 6, 24 und 96 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated, NY, USA
Corning Flask 0,2 µm Vent Cap, 7 und 75cm ² Cell Culture Flask	Corning Incorporated, NY, USA
QuantiTect SYBR green	Quiagen, Hilden, Deutschland
Stabpipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml	Corning Incorporated, NY, USA
DC Protein Assay Reagent A, B und S	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Deferoxamine mesylate salt	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
dNTPs	NEB, Frankfurt, Deutschland
Dulbeccos Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Emsure Methanol for analysis	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Schnapp-, und Schraubgefäße 0,5-2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ethanol Absolut	J.T. Baker Deventer, Holland
FastStart Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
FcR Blocking Reagent Mouse	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA, Cölbe, Deutschland
Film für Western Blot	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Filter	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
G418 disulfate salt powder, Bio Reagent suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
GAHK20-1KT Glukose (HK) Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
H ₂ O ₂	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
HCL	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heat sealing film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Braun, Melsungen, Deutschland
Kaleidoscope pre-stained standard protein marker	Biorad, München, Deutschland
Kanülen	BD Lifesciences, Basel, Schweiz
Kryo-Röhrchen	Corning Incorporated, NY, USA
L-Glutamin	Greiner, Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Luminol sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Sucofin Milchpulver	Deutschland
Multiwell Zellkulturplatten und Röhrchen	TSI, Zeven, Deutschland
Murines Interferon γ	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Mycoplasmen Kit	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
Nuclease freies Wasser	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Para-Hydroxycoumarin-Säure	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
PCR Platten Twin.tec 96-Well	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Pursekt Wipes-FD, Flächendesinfektion von Medizinprodukten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran	Merz Hygiene, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
QuantiTect SYBR green	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
Realplex-Platte	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reblot Stocklösung	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reverse Transcription System	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
RIPA Buffer	Promega, Fitchburg, USA
RNAse ZAP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 w/o l_Glutamin W 2,0g/L NaHCO ₃ sterile filtered	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spritzen	Pan 784 Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tris	Braun, Melsungen, Deutschland
Trypsin	USB, Cleveland, USA
Tween 20	Pan 784 Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Western Blot Kassette	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Zellschaber	Siemens, Erlangen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (=Falcons)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Greiner, Bio One, Frickenhausen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren werden die Zellen auf eine Konzentration von 3 Mio Zellen/ml Medium eingestellt. In Kryoröhrchen (Corning Incorporated, NY, USA) wird ein definiertes Volumen des Einfriermediums, bestehend aus 20% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) und 80% FCS (fetalem Kälberserum; PAA, Cölbe, Deutschland), vorgelegt. Hierauf wird pro Kryoröhrchen dasselbe Volumen an Zellsuspension gegeben. Die Endkonzentrationen betragen 10% DMSO, 40% FCS und 50% RPMI („Roswell Park Memorial Institut“ Zellkulturmedium, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland). Die Zellen werden in Isopropanol-Kryoboxen bei -80°C eingefroren, damit ein langsames Herunterkühlen der Zellen gewährleistet wird. Für längere Einfrierzeiten werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen werden bei Raumtemperatur zum Auftauen gebracht. Sobald der Inhalt der Kryoröhrchen flüssig ist, wird dieser in Zentrifugenröhrchen mit vorgelegtem Zellkulturmedium überführt, abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und in 75 cm^2 Vent-Cap Zellkulturflaschen (Corning Incorporated, NY, USA) inkubiert.

3.2.1.2 Medium und Selektionsantibiotika

Die Zellen werden in RPMI-Medium mit 10% Fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin (Greiner, Bio One, Frickenhausen, Deutschland) und 100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin-Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland) inkubiert. Zudem werden 80 $\mu\text{g/dl}$ Blasticidin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 800 $\mu\text{g/dl}$ G418 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) als Selektionsantibiotika eingesetzt, um die Klone stets unter Selektionsdruck zu halten. Auch für sämtliche Inkubationszeiten der Versuche werden die Zellen stets unter Selektionsdruck gehalten. Für die Mykoplasmentests wird auf Penicillin/Streptomycin und Selektionsantibiotika verzichtet.

3.2.1.3 Passage und Kultur der Zellen

Die Zellen werden direkt nach dem Auftauen für 3-4 Tage ohne und anschließend nur noch mit Selektionsantibiotika inkubiert. Vor jeder Passage wird unter dem Mikroskop (Evos von AMG, Seattle, USA) kontrolliert, ob die Zellen eine ausreichende Zelldichte am Boden der Zellkulturflasche aufweisen. Hierbei wird darauf geachtet, dass mindestens 20% der Fläche noch nicht mit Zellen bewachsen ist.

Um die Zellen nach 3-4 Tagen zu passagieren, wird das Medium abpipettiert und verworfen, das restliche Medium mit 10 ml PBS (*engl.* Phosphate buffered saline, Sigma, Steinheim, Deutschland) vorsichtig vom Zellboden gespült. Anschließend werden die adhärennten Zellen mit 1 ml Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bestehend aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, hierfür erfolgt eine einminütige Inkubation bei +37°C.

Die Zellen werden in 9 ml Medium aufgenommen, in ein 50 ml-Falcon/Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und mit 1600 rpm 7 Minuten bei +4° C abzentrifugiert. Das Pellet wird in Medium resuspendiert und mittels Pipette und Vortex gründlich gemischt. Anschließend wird mithilfe des „CASY“-Zellzählsystems (Innovatis, Mannheim, Deutschland) die Konzentration an Zellen in der Suspension bestimmt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden Zellkulturflaschen (Corning, NY, USA) mit frischem Medium und einer definierten Menge an Zellen, meist 1-2 Millionen, inkubiert. Das Gesamtvolumen des Mediums mit Zellen beträgt hierbei 20 ml.

Anschließend befinden sich die Zellen bis zur nächsten Passage im Brutschrank bei +37°C und 5% CO₂.

3.2.1.4 Mykoplasmentest

Die Zellen werden regelmäßig auf den Befall mit Mykoplasmen getestet. Hierfür werden 200000 Zellen in 7 ml Medium ohne Penicillin/Streptomycin und ohne Selektionsantibiotika für mehrere Tage in Zellkulturflaschen inkubiert. Nach dem Farbumschlag des Mediums von rot auf gelb wird 1 ml des Mediums bei -20°C eingefroren und mittels eines auf qPCR (quantativer Polymerasekettenreaktion) basierenden Kits (Microsart AMP Myoplasma, Sartorius, Deutschland) auf Mykoplasmen untersucht. Die hier präsentierten Ergebnisse geben ausschließlich Messwerte mykoplasmenfreier Zellen wider.

3.2.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels PreSens Technologie

3.2.2.1 Funktionsprinzip

Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen wird der „Sensor Dish Reader“ der Firma PreSens Precision Sensing (Regensburg, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Versuchsaufbau, bei welchem die Zellen in einer 24-Well-Platte für 24 Stunden in einem stets geschlossenen Brutschrank verbleiben müssen. Am Boden eines jeden Wells

befindet sich ein chemischer Sensor. Die Platte steht für die Versuchsdauer von 24 Stunden auf dem zugehörigen „Dish Reader“, einer mit 24 Sensoren ausgestatteten Platte. Der „Dish Reader“ wiederum steht über ein Kabel mit einem Computer in Verbindung, der mit der zugehörigen Software „SDR_v38“ ausgestattet ist.

Zum Messprinzip: Am Boden eines jeden Wells befindet sich ein chemischer Sensor, der ein lumineszentes Farbstoffpolymergemisch enthält. Je nach Sauerstoffgehalt ändert sich das Signal, das der chemische Sensor emittiert. Diese Signaländerung im Sinne einer Emission wird vom „Dish Reader“, dem der Wellboden unmittelbar aufliegt, registriert und der Software zugeführt. Die mitgelieferte Software ermittelt anhand der Daten des „Dish Readers“ und vorangegangener Kalibrierungsdaten die zugehörigen Sauerstoffänderungen. Die ermittelten Daten werden in einer Exceldatei gespeichert, in der die absoluten Sauerstoffkonzentrationen in mg/dl im zeitlichen Verlauf dargestellt werden. In dieser Arbeit werden Sauerstoffmessungen alle 30 Sekunden durchgeführt.

3.2.2.2 Vorbereitung der Zellen und Versuchsdurchführung

Um die Zellen mit der PreSens-Technologie zu untersuchen, werden sie nach 3-4 Tagen Zellkultur geerntet. Es wird eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 200 000 Zellen pro ml Medium hergestellt. Eine 24-Well-Platte wird mit 1 ml Zellsuspension pro Well befüllt.

3.2.2.3 Zugabe von Interferon- γ

Für die Ansätze mit Interferon- γ (IFN- γ) werden pro Well 2 μ l einer verdünnten IFN- γ -Lösung (murines IFN- γ , Pepro Tech, Rocky Hill, USA) hinzupipettiert. Hierfür wird eine 1:10-Verdünnung einer 100 μ g/ml-Stocklösung mit rekombinantem murinen IFN- γ verwendet. Die Endkonzentration im Versuchsansatz beträgt somit 20 ng/ml. Pro Versuchstag werden bei jedem der zu untersuchenden Klone 2 Wells mit, 2 Wells ohne IFN- γ und 2 Wells Mediumkontrolle angesetzt. Die 24-Well-Platte wird auf den Dish-Reader im Brutschrank platziert. Hierbei ist auf eine übereinstimmende Ausrichtung von Platte und Dish Reader zu achten. Nach Starten der Software kann der Versuch begonnen werden. Hierfür darf der Brutschrank für die gesamte Versuchsdauer nicht geöffnet werden. Nach Ablauf der Versuchsdauer wird das Medium abgenommen, bei 1300 rpm und +4°C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues „Tube“ (*engl.*: Röhrchen) überführt und bis zur Bestimmung von Laktat- und Glukosekonzentration bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Proliferation

3.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Messung der Proliferation werden die Zellen nach 3-4 Tagen Kultur geerntet. Es wird eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 125 000 Zellen/ml Medium hergestellt und in 96-Well-Platten ausgesät. Jedes Well enthält 200 µl Zellsuspension. Somit beträgt die Konzentration 25 000 Zellen pro Well. Pro Klon und Versuchstag werden Fünffachwerte angesetzt. Die leer gebliebenen Wells werden mit RPMI-Medium aufgefüllt. Für die Messung der Proliferation unter Einfluss von IFN- γ wird eine Zellsuspension mit ebenfalls 125 000 Zellen/ml hergestellt. In das Falcon-Röhrchen, in welchem die Zellsuspension vorbereitet wurde, wird pro ml Zellsuspension 2 µl einer IFN- γ -Verdünnung gegeben. Es handelt sich um eine 1:10-Verdünnung einer 100 µg/ml-Stocklösung. Die Enkonzentration beträgt somit 20 ng/ml. Die so vorbereiteten Zellen können so mit der Multipette in 96-Well-Platten ausplattiert werden. Pro Klon und Versuchsansatz (also +/- IFN- γ) werden Fünffachwerte angesetzt.

3.2.3.2 Messung der Proliferation

Die so vorbereitete 96-Well-Platte wird für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen adhärent sind. Anschließend werden die Wells mit radioaktivem Methyl-³H-Thymidin gelabelt und für weitere 22 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 22 Stunden wird die Platte bei -80°C für mehrere Tage eingefroren. Nach dem Auftauen wird die Platte mit einem Harvester auf Filterplatten (beides von PerkinElmer, Massachusetts, USA) übertragen. Durch einen Betaplate-Counter (PerkinElmer, Massachusetts, USA) wird die Radioaktivität eines jeden einzelnen Wells gemessen. Die hierbei gemessene Radioaktivität, angegeben in counts per minute (cpm), dient als Parameter für den Thymidin-Uptake und somit für die Proliferationsaktivität der Zelle. Die Arbeiten mit Radioaktivität wurden freundlicherweise von Gabriele Schönhammer und Monika Wehrstein durchgeführt.

3.2.4 Laktatmessung

3.2.4.1 Herstellung des Zellkulturüberstandes

Um die Laktatproduktion der Zellen zu messen, werden sie nach 3-4 Tagen Kultur in einer Konzentration von 125 000 Zellen/ml Medium in 96-Well-Platten gegeben. Pro Klon werden fünf Wells entsprechend 200 µl und 25 000 Zellen angesetzt. Die Vorbereitung findet analog

zu dem Proliferationsansatz statt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wird das Medium der fünf angesetzten Wells geerntet und gepoolt, bei 1600 rpm und +4°C für sieben Minuten abzentrifugiert, in eine neue Tube überführt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

3.2.4.2 Laktatbestimmung

Die Messung der Laktatkonzentration erfolgt am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Regensburg. Prinzip der Messung ist eine enzymatische Umwandlung der Milchsäure durch die Laktatoxidase in Pyruvat und Wasserstoffperoxid. Das hier entstandene Peroxid bildet in Anwesenheit eines Farbstoffes und gemeinsam mit einer Peroxidase einen Farbstoff. Dieser Farbstoff kann durch Spektrophotometrie gemessen werden und erlaubt die Ermittlung der Laktatkonzentration der Probe.

3.2.5 Messung des Glukoseverbrauchs der Zellen

Das für alle Versuche verwendete RPMI-Medium enthält 8 mM Glukose. Der Glukoseverbrauch der Zellen lässt sich somit an der Differenz zur verbleibenden Menge an Glukose im Überstand ermitteln.

3.2.5.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Messung des Glukoseverbrauchs werden die Zellen für 24 Stunden in 24-Well-Platten inkubiert. Die Zellkonzentration beträgt 200 000 Zellen/ml. Die Überstände werden nach Ende der Inkubationszeit abgenommen und bei 1300 rpm und +4°C für 7 Minuten abzentrifugiert. Bis zur Messung werden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Glukose Assay Kit

Mithilfe des Glukose (HK) Assay Kits von Sigma wird die Glukosekonzentration bestimmt. Es handelt sich um eine enzymatische Umsetzung der Glukose und anschließende Änderung der Absorption bei 340 nm Wellenlänge. Hier die zugrundeliegenden Reaktionen: Glukose wird durch die Hexokinase unter Verbrauch von ATP in Glukose-6-Phosphat und ADP umgewandelt. Glukose-6-Phosphat wird über die ebenfalls im Reaktionsansatz vorhandene Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) in 6-Phosphoglukonat umgewandelt. Hierzu ist eine Reduktion des vorhandenen NAD unter Bildung von NADH nötig.

Die Proben werden gemäß den Herstellerangaben mit dem Kit gemessen. Der Anstieg des NADH-Gehaltes bewirkt einen Anstieg der Absorption bei 340 nm Wellenlänge. Die Ergebnisse errechnen sich aus dem Abgleich mit der Standardgerade des jeweiligen Messdatums und unter Miteinberechnung des BLANK-Wertes.

3.2.6 Durchflusszytometrie

3.2.6.1 Prinzip und Gerät

Mit der Durchflusszytometrie können verschiedene Marker der Zellen analysiert werden. Diese Technologie basiert u.a. auf dem Prinzip der Bindung eines Antikörpers an ein Zielprotein. Der Antikörper ist konjugiert mit einem Fluoreszenzmarker. Ist das Zielprotein auf oder in der Zelle vorhanden, kann dies anhand der Antikörperbindung detektiert werden. Der auf den Zellen gebundene Antikörper wird im Laserstrahl angeregt; das dabei entstehende Fluoreszenzlicht kann detektiert werden.

Je nach Durchflusszytometer können mehrere verschiedene Eigenschaften gleichzeitig untersucht werden. Dafür müssen verschiedene Antikörperkonjugationen verwendet werden. Für die Messung wird das BD LSR II Flow Cytometer (Durchflusszytometer) verwendet. Für die Auswertung wird mit der FlowJo-Software gearbeitet.

3.2.6.1 Vorbereiten und Färben der Zellen

Es wird eine Zellsuspension mit 200 000 Zellen pro ml Medium hergestellt. Eine 24-Well-Platte wird mit 1 ml Zellsuspension pro Well befüllt. Die Zellen werden 3-4 Tage inkubiert. Für die Ansätze mit IFN- γ werden pro Well 2 μ l einer verdünnten IFN- γ -Lösung hinzupipettiert. Hierfür wird eine 1:10-Verdünnung einer 100 μ g/ml-Stocklösung mit rekombinantem murinen IFN- γ verwendet. Die Endkonzentration im Versuchsansatz beträgt somit 20 ng/ml. Die so vorbereitete 24-Well-Platte wird für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird das Medium abpipettiert und die Zellen werden vom Boden der Wells mit 100 μ l Trypsin/EDTA gelöst. Es folgt eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur von drei Minuten. Nach Zugabe von 500 μ l RPMI-Medium in jedes Well werden die Zellen mit Medium und Trypsin in FACS-Kunststofftubes überführt und mit 1600 rpm bei +4°C für 7 Minuten abzentrifugiert. Es folgt ein Waschschriff mit FACS-Waschpuffer. Nach diesem wird der in 1 ml Waschpuffer resuspendierte Inhalt auf zwei Tubes aufgeteilt für ungefärbte Zellen oder Intrazellulärfärbungen. Es wird erneut zentrifugiert. Das Pellet wird nach Abschütten des

Überstandes vorsichtig resuspendiert. Pro Tube wird 1 µl FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben und für 15 Minuten bei +4°C inkubiert. Dieser Schritt verhindert unspezifische Bindungen. Es folgt anschließend auf Eis und im Dunkeln die Zugabe der Antikörper. Nach gründlichem Vortexen werden die Zellen für 30 Minuten bei +4°C mit den Antikörpern inkubiert.

Nun wird pro Tube 1 ml PBS zugegeben, die Zellen werden wieder mit 1600 Umdrehungen pro Minute bei +4°C für 4 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wird abgegossen, die Zellen in 1ml PBS aufgenommen und wieder abzentrifugiert (1. und 2. Waschschrift). Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt werden die Zellen zur Messung in 300 ml PBS aufgenommen und noch am selben Tag gemessen. Alternativ werden die Zellen in 250 ml Paraformaldehydlösung aufgenommen und so für Messungen innerhalb der nächsten sieben Tage konserviert.

Für die Intrazellulärfärbungen stammen die folgenden Lösungen aus dem Zytofix/Zytoperm-Kit von BD (BD Lifesciences, Basel, Schweiz). Hierfür werden die Zellen wie im oben beschriebenen Protokoll mit einer Oberflächenfärbung versehen. Nach dem ersten Waschschrift im Anschluss an die Oberflächenfärbung werden die Zellen mit 250 µl Zytofix/Zytoperm für 20 Minuten bei +4°C inkubiert und so permeabilisiert. Anschließend wird zu jedem Tube 1 ml des einfachen PermWash Waschpuffers gegeben und die Zellen werden mit 1600 rpm bei +4°C für 4 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Nach Abschütten des Überstandes nach der zweiten Zentrifugation werden die Zellen auf Eis und im Dunkeln mit den Antikörpern gefärbt, gevortext und für 30 Minuten bei +4°C inkubiert. Es schließt sich ein Waschschrift mit 1 ml des PermWash Waschpuffers und ein Waschschrift mit PBS an. Die Zellen werden für die Messung in 300 µl PBS aufgenommen.

Zusätzlich zu den gefärbten Zellen wird vor der Messung am Durchflusszytometer die Kompensation vorbereitet: Hierzu werden Beads verwendet (CompBeads Antimouse Ig k negative control compensation particle set, BD, Basel, Schweiz), welche mit den im jeweiligen Versuch verwendeten Antikörpern gefärbt werden und zur Kalibrierung der Laser im Durchflusszytometer benötigt werden. Diese Kalibrierung erlaubt eine größtmögliche Differenzierung der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale in der Durchflusszytometrie.

3.2.7 Hypoxiebehandlungen

3.2.7.1 Hypoxieschrank

Die Vorbereitung der Zellen erfolgt in derselben Weise wie für die übrigen Proliferations- und Laktatmessungen: Nach 3-4 Tagen Zellkultur werden die Zellen geerntet und in Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration wird auf 125 000 Zellen/ml Medium eingestellt. Diese Suspension wird in 96-Well-Platten mit 200 µl/Well ausplattiert. Pro Klon werden fünf Wells angesetzt. Die Platten zur Laktat- und Proliferationsbestimmung unter Normoxie werden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei einer Sauerstoffkonzentration von 20% inkubiert. Die Platten zur Laktat- und Proliferationsbestimmung unter Hypoxie werden für 24 Stunden im Hypoxieschrank bei 1% Umgebungssauerstoff inkubiert (New Brunswick Galaxy 14 S, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Nach 24 Stunden Inkubationszeit werden die Proliferationsplatten aus Hypoxie- und Normoxieansatz mit ^3H -Thymidin gelabelt, weitere 5 Stunden inkubiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Die weiteren Schritte bestehen aus dem Ernten der radioaktiv markierten Platten und der Bestimmung der Radioaktivität mittels Beta-Plate-Counter wie im Kapitel „Proliferation“ beschrieben. Die Proliferation der Zellen geht mit einem Einbau des radioaktiven Thymidins einher und somit kann die Radioaktivität als Parameter für die Proliferation herangezogen werden. Bei den Platten zur Laktatmessung von Normoxie und Hypoxie werden die fünf Wells eines jeden Klons gepoolt, bei 1300 rpm, $+4^\circ\text{C}$ und für 7 Minuten zentrifugiert und bis zur entgeltigen Messung bei -20°C eingefroren. Die Messung selbst gleicht dem Prozedere im Kapitel „Laktat“.

3.2.7.2 Chemische Hypoxie mit 2,2Dipyridyl und Deferoxamin

3.2.7.2.1 Vorbereitung der Zellen

In diesem Versuch werden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden mit den zwei Hypoxie induzierenden Agenzien 2,2-Dipyridyl (DP), einem Chelator zweiwertigen Eisens, und Deferoxamin (DFX), einem Stabilisator von HIF1 α inkubiert. Beide werden von Sigma-Aldrich, Steinheim in Deutschland, hergestellt. Ziel des Versuches ist die Bestimmung der Laktatproduktion und der Viabilität der Zellen nach Exposition mit diesen Agentien. Die Viabilität wird sowohl mit Durchflusszytometrie als auch mithilfe des CASY bestimmt.

Die B16-Klone werden nach 3-4 Tagen Zellkultur vom mit PBS gewaschenen Boden der Zellkulturflasche abtrypsiniert, geerntet, abzentrifugiert, in 4 ml Medium resuspendiert und die Konzentration der Zellsuspension wird bestimmt.

Folgendes Vorbereitungs- und Pipettierschema wird verwendet: Eine Zellsuspension mit 750000 Zellen/6 ml Medium wird hergestellt. Die Stocklösung des DP in einer Konzentration von 100 mM gelöst in Ethanol, wird 1:100 verdünnt. Empfohlen wird vom Hersteller ein Einsatz von 100 μ M in der Zellkultur. Zusätzlich wird noch die Konzentration von 10 μ M ausgetestet. Da die Stocklösung in Ethanol gelöst ist, wird zusätzlich noch eine 1:100 bzw 1:10 Verdünnung reinen Ethanols als Kontrolle verwendet, um Effekte des Ethanols auszuschliessen. Deferoxamin wird entsprechend den Herstellerangaben in Aqua dest. gelöst, sodass eine 100 mM Lösung entsteht. Die Endkonzentration in der Zellkultur soll 100 μ M betragen. So wird 1 μ l der Lösung auf 1 ml Zellkultur eingesetzt.

In einer 24-Well-Platte werden 1 ml/Well Zellsuspension entsprechend 125 000 Zellen vorgelegt. Für die Ansätze mit 100 μ M DP werden 100 μ l der DP-Verdünnung hinzugegeben. Die Ansätze mit 10 μ M DP erhalten 10 μ l der DP-Verdünnung und 90 μ l Medium. Die Ansätze mit 100 μ M DFX erhalten je 1 μ l der 100 mM DFX-Lösung. Die Negativkontrolle erhält 100 μ l Medium, um das Verhältnis Medium:Zellen konstant zu halten. Die so vorbereitete 24-Well-Platte wird für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.7.2.2 Abnahme der Überstände zur Laktatmessung

Die Überstände der Platte zur Viabilitätsmessung werden in 15 ml Zentrifugenröhrchen abgenommen. In jedes Well werden als Verdunstungsschutz 500 μ l PBS pipettiert. Die Überstände werden bei 1300 rpm und +4°C für 7 Minuten zentrifugiert, in ein neues Tube überführt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

3.2.7.2.3 Viabilitätsmessung mittels CASY

Pro Well werden 100 μ l Trypsin/EDTA eingesetzt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion des Trypsins wird mit 500 μ l /Well Medium gestoppt. Der Inhalt eines jedes Wells wird in das entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt mit 1300 rpm bei +4°C für 7 Minuten. Der Überstand wird abgeschüttet, das Pellet vom Boden gelöst und mit 300 μ l Medium vermischt.

Anschließend kann mittels CASY gemessen werden, wie viele der ursprünglich ausgesäten Zellen unter dem Einfluss von chemischer Hypoxie noch viabel sind.

3.2.7.2.4 Apoptosefärbung der Zellen unter Chemischer Hypoxie

Eine alternative Bestimmung des Anteils der apoptotisch gewordenen Zellen ermöglicht die Durchflusszytometrie. Die Platten für die FACS-Färbung inkubieren für 48 Stunden im

Brutschrank. Im Anschluss daran wird der Überstand in FACS-Tubes überführt; auf den Wellboden kommen 100 µl Trypsin/EDTA. Nach 3 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Trypsinreaktion mit 500 µl Medium/Well gestoppt. Der Inhalt jeden Wells wird in das entsprechende FACS-Tube überführt. Es folgt das Abzentrifugieren bei 1600 rpm und +4°C für 4 Minuten, Abschütten des Überstandes und Lösen des Pellets. Dieser Waschschrift wird mit 1 ml PBS wiederholt. Anschließend kommen in jedes Tube 200 µl des einfachen, also mit H₂O dest. 1:10 verdünnten 10x Annexinbindepuffer (BD Pharmingen, San Diego, USA). Zusätzlich werden in jedes Tube 5 µl Annexin V-FITC und 20 µl 7AAD pipettiert (beides ebenfalls BD Pharmingen, San Diego, USA). Die Tubes werden gründlich gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Eine Kompensation mit ungefärbten Zellen, Zellen nur gefärbt mit 7AAD und Zellen nur mit Annexin V-FITC wird ebenfalls hergestellt. Anschließend kann die Messung am Durchflusszytometer erfolgen.

3.2.8 RT-PCR (Real-Time Polymerase-Chain-Reaction)

3.2.8.1 Vorbereitung der Zellen

Für die RT-PCR werden die Zellen nach 3-4 Tagen Zellkultur wie im Abschnitt „Passage und Kultur der Zellen“ neu passagiert. Hierfür wird wie für die Zellkultur das Medium abpipettiert, das restliche Medium vorsichtig mit PBS vom Flaschenboden gespült. Anschließend werden die Zellen vom Boden abtrypsiniert und nach Zugabe von RPMI Medium abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und die Zellkonzentration der entstandenen Suspension mittels CASY ermittelt.

Für die Vorbereitung der Zellen werden 6-Well-Platten verwendet. In die Platten werden 2 ml Medium abzüglich der Menge, die einer Million Zellen entspricht, vorgelegt. Es wird die Menge an Zellsuspension, die eine Million Zellen enthält, hinzugegeben. Die Platte wird vorsichtig auf einer festen Unterlage drei- bis viermal hin- und hergeschoben, um die Zellen gleichmäßig am Boden des Wells zu verteilen.

Für die Versuche zum Nachweis von Cyclooxygenase_1 und 2, Arginase_1 und 2, IDO 1 und 2, und TNF werden 2,5 Millionen Zellen in 4 ml Medium in der 6-Well-Platte verwendet.

Die Zellen werden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.8.2 Herstellung der Lysate

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Es wird kontrolliert, ob die Zellen adhärent sind und ob der Wellboden zu nicht mehr als ca. $\frac{3}{4}$ der

Fläche bewachsen ist. Anschließend wird das Medium vorsichtig abgenommen und verworfen.

Ab hier geschehen alle Schritte auf Eis. Die Arbeitsfläche und die Handschuhe werden RNase frei gemacht. Verwendet werden ausschließlich RNase freie Pipettenspitzen.

Auf den Boden jedes Wells werden nun 350 µl des mit β-Mercaptoethanol versetzten RLT-Puffers des Qiagen RNA-Isolationskits „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Dies bedeutet, dass im Vorfeld die benötigte Menge mit 10 µl β-Mercaptoethanol in je 1 ml RLT Puffer hergestellt wurde und in einem 50er Falcon Röhrchen aufbewahrt wurde.

Nach Zugabe der 350µl wird kurz gewartet. Anschließend werden die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden geschabt und in ein RNase freies 1,5 ml Schnapptube überführt, gründlich gevortext und bis zur Weiterverwendung bei -80°C eingefroren. Alternativ kann sich auch direkt die Isolierung von RNA ohne vorheriges Einfrieren anschließen.

3.2.8.3 Isolierung von RNA

Der nächste Schritt entspricht der Isolierung reiner RNA gelöst in H₂O mit den Zelllysaten als Ausgangsmaterial. Dies erfolgt mit dem RNA-Isolationskit gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Lysate werden, falls sie eingefroren waren, auf Eis aufgetaut.

Zum Prinzip der RNA-Isolierung: Die in dem Kit enthaltenen Mini-Spin-Columns enthalten eine Membran auf Silicabasis, welche bei Anwesenheit des stark salzhaltigen RLT-Puffers bis zu 100 µg RNA binden kann. Die hier gebundene RNA wird in den letzten Schritten des Protokolls eluiert und anschließend in RNase freiem H₂O aufgenommen.

Zum praktischen Vorgehen:

Es werden vorab die benötigten Lösungen RPE-Puffer, RLT-Puffer und verdünnter 70%er Ethanol gemäß den Herstellerangaben vorbereitet.

Zunächst wird das Lysat mit einer 2-ml-Spritze und aufgesetzter spitzer Kanüle (BD Lifesciences, Basel, Schweiz) zehnmal geschert. Dies dient der Zerkleinerung der DNA, damit diese in den folgenden Schritten nicht die Bindungsstellen auf der Membran besetzt. Auf das so gescherte Lysat wird 350 µl 70%igen Ethanols gegeben und ein paarmal zum Mischen auf- und abpipettiert. Die Zugabe des Ethanols optimiert die Bindung der RNA an die Membran. Die nun 700 µl Gesamtvolumen werden auf die RNeasy-Säule geladen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 10 000 rpm für 15 Sekunden und +1°C. Der Durchlauf wird verworfen. Es werden 350 µl des RW 1 Puffers hinzugegeben, der Zentrifugationsschritt wird wiederholt. Der Durchlauf wird verworfen. Es werden 350 µl des RW1 Puffers hinzugegeben und erneut zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es folgt die Zugabe von

500 µl RPE-Puffer und eine weitere Zentrifugation. Der Durchlauf wird verworfen. Es werden 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, anschließend wird 2 Minuten bei 10 000 rpm und +1°C zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Tube gesetzt und es wird 1 Minute bei 10 000 rpm und +1°C zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml Tube gesetzt. Es folgt nun der Eluierungsschritt mit H₂O. Dafür werden pro Tube 30-50 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert. Es wird eine Minute bei 10 000 rpm und 0°C zentrifugiert. Der Durchfluss wird im Anschluss erneut auf die Säule pipettiert und abzentrifugiert. Nun befindet sich die RNA im Durchfluss, die Säule kann verworfen werden.

Die in Wasser eluierte RNA wird am NanoDrop (PeqLab, Erlangen, Deutschland) auf Verunreinigungen und DNA-Rückstände überprüft. Hierzu dienen die Absorptionseigenschaften bei 260, 280 und 230 nm. Zudem wird die Konzentration an RNA in ng/µl ermittelt. Die RNA wird bei -80°C eingefroren.

Außerdem erfolgt eine Qualitäts- und Reinheitskontrolle der RNA mittels des Bioanalyzers der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland).

3.2.8.4 Reverse Transkription

Ziel ist die Herstellung komplementärer DNA (cDNA) aus der zuvor isolierten RNA. Hierzu wird eine reverse Transkriptase verwendet; diese schreibt die RNA in komplementäre DNA um. Hierzu werden Random Primer verwendet, um die Umschreibung des gesamten RNA-Stranges zu gewährleisten.

Zum praktischen Vorgehen werden benötigt: Das Reverse Transkription System des Herstellers Promega (Fitchburg, USA), dies enthält die Reverse Transkriptase, die Random Primer sowie den 5x Reverse Transkription Puffer. Zudem wird ein dNTP-Mix aus Adenosin, Guanosin, Cytosin und Thymin und nukleasefreies Wasser sowie die entsprechenden RNA-Proben benötigt.

Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Handschuhe, Ständer und sonstiges Verbrauchsmaterial wird RNase-frei gemacht. Nach Auftauen der RNA-Proben und der benötigten Lösungen wird zunächst ein dNTP-Mix aus je 10µl Adenosin, Guanosin, Cytosin und Thymin sowie 60µl nukleasefreiem Wasser hergestellt. Es wird ein Mastermix aus diesem dNTP-Mix und den Random Primern hergestellt, wobei auf 1µl dNTP-Mix je 1µl Random Primer kommen. 2µl dieses Mastermixes sind ausreichend für eine Probe, welche 500 ng RNA enthält.

Es werden 13µl nukleasefreies Wasser (Gibco, Eggenstein, Deutschland) abzüglich des Volumens, welches 500 ng RNA entspricht, in RNase-freie, verschließbare 0,5 ml Tubes

vorgelegt. Pro Tube werden nach nochmaliger vorsichtiger Vermischung 2 µl des Mastermixes zum nukleasefreien Wasser hinzupipettiert. Nun wird das Volumen, welches nach der Messung am Nanodrop 500 ng RNA entspricht, hinzugegeben. Die RNA wird im Light Cycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei +65°C für fünf Minuten denaturiert. Die Proben werden auf Eis gestellt, pro Tube werden 4 µl des fünffachen RT-Puffers hinzupipettiert und der Tubeinhalt durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Nach kurzem Herunterzentrifugieren werden die Proben zurück in den Cycler gestellt und zwei Minuten bei +42°C inkubiert. Dann wird pro Tube 1 µl MMLV Reverse Transkriptase hinzugegeben. Es folgt für weitere 50 Minuten die Inkubation bei +42°C, anschließend bei +70°C für 15 Minuten die Inaktivierung der MMLV Reversen Transkriptase. Die cDNA wird nun bei -20°C gelagert.

3.2.8.5 Vorbereitung der RT-PCR

Vorbereitung der Proben: die cDNA wird 1/10 verdünnt. Es werden 9 µl nukleasefreies Wasser in einem 0,5 ml Tube vorgelegt und 1 µl der gut durchmischten cDNA hinzugegeben. Ein interner Standard zur Bestimmung der cDNA wird für jedes Gen mitbestimmt.

Für den Standard wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe richten sich nach dem zu bestimmenden Gen. Verdünnungen von 1:5 bis zu 1:20 000 sind möglich, damit die Proben für ein genaues Messergebnis im Bereich der Standardkurve liegen.

Zum Prinzip der Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Die Tubes werden vorbereitet, eine definierte Menge an H₂O vorgelegt und die Probe hinzugegeben. Aus dieser Verdünnung wird wiederum eine definierte Menge entnommen und in ein Tube, in welchen ebenfalls H₂O vorgelegt ist, pipettiert. So entsteht eine höhere Verdünnungsstufe. Es wird dabei darauf geachtet, dass nicht weniger als 1µl pipettiert werden muss, um Ungenauigkeiten durch zu kleine Pipettiermengen zu vermeiden.

Jedes Well, also jeder Reaktionsansatz besteht aus 5µl SyBrGreen (QuantiTect SYBR green Qiagen, Hilden, Deutschland), je 0,5 µl forward und reverse Primern, 3 µl nukleasefreiem H₂O und 1 µl Probe. Die Primer werden vor ihrer Verwendung verdünnt: aus einer 100 µM Stocklösung wird eine mit H₂O 1:10 verdünnte Gebrauchslösung hergestellt. Von dieser Gebrauchslösung werden nun 0,5 µl pro Reaktionsansatz verwendet.

Für jedes Gen wird also ein Mastermix aus SyBrGreen, Primern und nukleasefreiem Wasser hergestellt. Dabei werden beim Standard für jede Verdünnungsstufe und für die Negativkontrolle (=H₂O) Doppelwerte und bei den Proben Tripelwerte veranschlagt.

Nach dem Herstellen und vorsichtigen Mischen des Mastermixes wird die Platte, die zum Pipettieren des Realplexansatzes benötigt wird, in einen Eisblock gesetzt. Damit die Reaktionsansätze nicht einfrieren, muss der Eisblock zuvor für fünf Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden.

Es werden in jedes Well 9 µl des Mastermixes vorgelegt. Anschließend wird gemäß einer vorher festgelegten Plattenbelegung der Standard und die Proben in die Realplex-Platte pipettiert, jeweils mit einem Volumen von 1 µl. Die Platte wird mit einer Kunststoffolie (Platte und Folie von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) fest versiegelt und für etwa zehn Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert.

3.2.8.6 Realplex

Verwendet wird der Mastercycler epgradient S von Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

Das Prinzip der Realplex-Technologie entspricht einer Polymerasekettenreaktion, bei der die verwendete Polymerase die einsträngige cDNA der Proben mithilfe der dNTPs als Bausteinen zu einer doppelsträngigen DNA amplifiziert. Es werden mehrere Zyklen durchlaufen, in denen die nun entstandene doppelsträngige DNA wieder denaturiert, also in einzelsträngige DNA verwandelt wird, anschließend werden beide Stränge wieder amplifiziert. Diese Schritte kann man theoretisch bis zum Ende der benötigten Substrate weiterführen.

Das im Mastermix zugegebene CYBR Green entspricht einem Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Dieser Farbstoff erzeugt eine Fluoreszenz, welche von dem mit CCD Kamera und UV-Lampe ausgestatteten PCR Gerät detektiert werden kann. Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Die Besonderheit der Real Time PCR besteht darin, dass nicht die absolute Menge an Fluoreszenz bzw. Amplifikationsprodukten gemessen bzw. berechnet wird, sondern die Geschwindigkeit, mit der die Amplifikationsprodukte zunehmen. Dies bietet den Vorteil einer Abbildung in Echtzeit der Amplifikationen. Die Auswertung der Steigung erlaubt der Software Rückschlüsse auf die Menge an amplifizierter DNA, da Störungen am Ende oder Anfang des Versuchs ausgeschlossen werden können.

3.2.8.7 Auswertung

Als Grundlage der Berechnung dient der Schwellenzyklus, „threshold cycle“ oder kurz ct; er beschreibt den Zyklus, bei dem das Gerät zum ersten Mal Fluoreszenz detektiert hat. Je größer diese Zahl, also je später dieser Zyklus, desto geringer ist die Menge an vorhandener DNA. Diese Zahl verhält sich umgekehrt proportional zu der Menge an Fluoreszenz, die in

„Amount CYBR“ angegeben wird und als Berechnungsgrundlage dient.

Ein Housekeepergen, in diesem Falle das Gen der 18S-ribosomalen RNA wird als Bezugsgrösse mit untersucht.

Für die Auswertung werden zunächst Durchschnittswerte der Triplets gebildet. Der so entstandene Wert wird auf den durchschnittlichen 18S Wert der jeweiligen Probe bezogen; diesem Wert liegt ebenfalls ein Triplet zugrunde. Das Verhältnis Amount CYBR Probe/ Amount CYBR 18S ist die größtmögliche Annäherung an den Gehalt der cDNA in der entsprechenden Probe. Der Standard dient als Qualitätskontrolle: Alle Proben sollten nahe an der Standardkurve liegen und sich in ihrer Konzentration zwischen höchster und geringster Standardkonzentration bewegen.

Zudem muss kontrolliert werden, dass die Doppelwerte des Standards nicht weit auseinanderliegen; ebenso verhält es sich mit den Tripelwerten der Proben.

Die Schmelzkurve ist ebenfalls ein Qualitätsmaß und versichert, dass nur ein Genprodukt amplifiziert worden ist.

3.2.9 Western Blot

3.2.9.1 Prinzip

Die Proteine der Proben werden anhand ihrer Größe und Ladung in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Von dem Gel werden sie mittels einer angelegten Niedrigspannung auf eine Membran übertragen. Auf dieser Membran wird das Zielprotein mit einem Primärantikörper detektiert. Die Bindung desselben wiederum wird mit einem Sekundärantikörper nachgewiesen, an den eine Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidaseaktivität führt in Anwesenheit einer ECL-Substratlösung (Abkürzung für *engl.*: „enhanced chemiluminescence“) zu einer chemischen Reaktion, die durch Auflegen eines Filmes sichtbar gemacht werden kann.

3.2.9.2 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen werden nach drei bis vier Tagen in Kultur neu passagiert. Wie bei jeder Passage wird eine Suspension mit einer definierten Zellkonzentration hergestellt. Es werden 6-Well-Platten vorbereitet, hier werden 2 ml RPMI-Medium abzüglich der Menge, welche 1 Million Zellen enthält, vorgelegt. Anschließend wird 1 Million Zellen hinzugegeben. Die Platte wird auf einer festen Unterfläche hin- und hergeschoben, um die Zellen am Wellboden gleichmäßig zu verteilen.

Pro Klon werden zwei Wells mit je 1 Million Zellen angesetzt. Die 6-Well-Platten werden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.9.3 Herstellung der Proteinlysate

Für die Herstellung der Proteinlysate werden die Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit unter dem Mikroskop beurteilt, ob sie adhärent und nicht zu dicht gewachsen sind.

Anschließend werden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Die Überstände werden abgenommen und entweder verworfen oder im Zellprogramm zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Der Boden der Wells wird zwei Mal vorsichtig mit 1000 µl PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Auf eine anschließende vollständige Entfernung des verbleibenden PBS nach dem zweiten Spülschritt ist zu achten.

Auf den Boden eines Wells werden 100 µl des RIPA-Puffers (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland), der zusätzlich Protease-Inhibitor enthält, gegeben. Die Zellen am Boden des Wells werden nach ein paar Sekunden Wartezeit mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die entstandene Mischung aus lysierten Zellen und RIPA-Puffer wird auf das zweite Well pipettiert, welches für denselben Klon angesetzt worden ist. Hier wird nach ebenfalls kurzer Wartezeit das Lysat vom Wellboden geschabt, eine Minute gevortext und bei -80°C eingefroren.

3.2.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate

Vor Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Lysate auf Eis aufgetaut und 15 Minuten bei +4°C und 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem gewünschten Proteinlysate, während sich übrige Zellbestandteile im Pellet befinden. Der Überstand wird aliquotiert und nicht verwendete Aliquots bei -80°C eingefroren. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird das „Bio Rad DC Protein Assay Kit“ von Bio Rad, München, Deutschland, verwendet.

Das Prinzip der Proteinbestimmung ist die photometrische Messung des Farbumschlages der im Kit enthaltenen Indikatorsubstanz bei 650 nm. Der Messung liegt eine Bindung des enthaltenen Proteins mit Cu^{2+} -Ionen, welche in alkalischer Lösung einen Komplex bilden, zugrunde. Die Ionen werden reduziert und bilden mit dem enthaltenen Folin-Reagenz einen blauen Komplex. Dieser Farbumschlag wird als Maß für die Proteinkonzentration herangezogen.

Als Standard wird Bovines Serum Albumin (BSA von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in

einer Konzentration von 1500 µg/ml bis 46,75 µg/ml verwendet. Von den Proteinlysaten wird in einer 96-Well-Platte eine 1:20-Verdünnung hergestellt. Diese setzt sich zusammen aus 19 µl PBS und 1 µl Probe. Wiederum 1 µl dieser Verdünnung wird für die Messung mit dem Kit verwendet.

Aus der photometrischen Messung, dem Abgleich mit der Standardgerade und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors lässt sich die Proteinkonzentration im Lysat in µg/µl errechnen.

3.2.9.5 Gießen der Gele

Benötigte Reagenzien:

- Obergelpuffer: Tris/HCl 30 g mit H₂O ad 500 ml
- Untergelpuffer: Tris/HCl 90,83 g mit H₂O ad 500 ml
- Acrylamid (30%): 146 g Acrylamid mit H₂O ad 500 ml
- SDS-Stammlösung : 10 g mit H₂O ad 100 ml
- 1M Tris-Puffer Tris/HCl 13 g, mit H₂O ad 100 ml
- 2x SDS-Probenpuffer: 10 ml Glycerin, 5 ml Tris-Puffer, 2 g SDS, 5 ml β-Mercaptoethanol, 10 ml Bromphenolblau: mit H₂O ad 50 ml

Zur Herstellung der Gel-Stammlösungen werden benötigt:

- 5%-Sammelgel-Stammlösung: 25 ml Obergelpuffer, 1ml SDS (10%), 16,65 ml Acrylamid (30%) mit H₂O ad 100ml
- 12%-Trenngel-Stammlösung: 25 ml Untergelpuffer, 1ml SDS (10%), 40 ml Acrylamid (30%) mit H₂O ad 100ml

Zudem wird verwendet:

- TEMED
- Ammoniumpersulfate (APS), 10% , in H₂O (40µg/40µl H₂O)

Zum Gießen der Gele werden zunächst die benötigten Glasplatten und Ständer mit Wasser und Isopropanol rückstandsfrei gereinigt, mit einem Abdichtungsgummi versehen und in den zugehörigen Aluminiumständer gestellt. Eventuelle Wasser- oder Isopropanolreste werden mit einem Zellstofftuch entfernt. Es folgt die Herstellung des Trenngels: 12%-ige Trenngel-Stammlösung wird mit TEMED (1µl/ml Stammlösung) und 10%-igem APS (5 µl/ml Stammlösung) vermischt. Nach ein paar Minuten Wartezeit wird die Gellösung mit einer 5ml-Spritze luftblasenfrei zwischen die Platten pipettiert. Die Platten im Ständer werden aufrecht hingestellt. Der Oberrand wird mit Isopropanol bedeckt, um ein Austrocknen des Gels zu

verhindern. Während das Trenngel fest wird, kann analog zum Trenngel das Sammelgel aus 5%-iger Sammelgel-Stammlösung, TEMED (1 µl/ml Stammlösung) und 10%-igem APS (5 µl/ml Stammlösung) hergestellt werden. Nach Abgießen des Isopropanols vom Trenngel-Oberrand wird nun das Sammelgel daraufpipettiert. Ein Kunststoffkamm zur Formung der späteren Probenaschen wird in das flüssige Sammelgel luftblasenfrei eingebracht. Das Gel kann nun mit dem Kamm bis zu Verwendung in feuchte Zellstofftücher eingehüllt bei +4°C für maximal eine Woche gelagert werden.

3.2.9.6 Vorbereitung der Proben

Sinn der vorangegangenen Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate ist, dass in jede Geltasche die gleiche Menge an Protein aufgetragen wird. Deswegen werden die Lysate mit PBS auf dieselbe Endkonzentration an Protein verdünnt. Anschließend werden die verdünnten Proben mit demselben Endvolumen an zweifachem SDS-Probenpuffer versetzt.

Ziel ist ein auf die Geltasche abgestimmtes Probenvolumen von 10 µl. Es ergibt sich folgendes Pipettier/Rechnungsschema: Pro Probe werden 5 µl PBS abzüglich der Menge an Lysat, welche 10 µg Protein enthält, vorgelegt. Es folgt das Volumen an Lysat, welches 10 µg Protein enthält. 10 µl 2x SDS-Probenpuffer werden hinzugefügt. Bei mehreren Gelen bietet sich ein Rechenschema mit vorbereiteten Proben im Überschuss an. Die so vorbereiteten Proben werden nun für 10 Minuten bei +95°C im Heizblock denaturiert.

3.2.9.7 SDS-Gelelektrophorese

Benötigt wird:

- 5x Lämmli-Elektrodenpuffer: Tris 15 g, Glycin 216 g, SDS 15 g mit H₂O ad 3000 ml (100 ml 5x Puffer werden verdünnt auf 1x mit 400 ml H₂O dest.)
- Elektrophorese-Kammer mit 80-100 V Gleichstrom (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Die Gele werden mit den umgebenden Glasplatten, jedoch ohne Ständer in der Elektrophoresekammer festgeklammert. Die Kammer wird mit Laufpuffer (=1x Lämmli-Elektrodenpuffer) gefüllt, bis die Glasplatten und somit das Gel vollständig von Laufpuffer umgeben ist. Der Kunststoffkamm wird entfernt und die vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert. Eine Tasche wird mit 5µl des Standards (Kaleidoscope PreStained Standard, Biorad, München, Deutschland) befüllt. Die Proben und der Standard laufen unter Gleichstrom von 100 V für ca. 30 Minuten im Sammelgel und bei 100-120 Volt für ca. 70 Minuten im Trenngel. Hierbei trennen sich die Proteinbestandteile von Standard und Proben

nach Molekülgröße, Struktur und Ladung auf. Die Gelelektrophorese wird gestoppt sobald die im Standard enthaltenen Proteingrößen von 15 bis 10 kDa makroskopisch gut voneinander zu trennen sind.

3.2.9.8 Western Blot

Dies entspricht der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Trägermembran:

Hierfür werden drei Puffer mit bestimmten Leiteigenschaften benötigt:

- Anodenpuffer A: Tris/HCl 36,3 g + Methanol 200 ml, mit H₂O ad 1000 ml
- Anodenpuffer B: Tris/HCl 3,03 g + Methanol 200 ml, mit H₂O ad 1000 ml
- Anodenpuffer C: ϵ -Amino-n-Caprinsäure 5,2 g + Methanol 200 ml, mit H₂O ad 1000 ml

Es werden drei Schichten Filterpapier mit Kathodenpuffer A getränkt, abgetropft und auf die Fläche der Blottingkammer (Biometra, Göttingen, Deutschland) gelegt, darauf kommen drei Schichten Filterpapier mit Kathodenpuffer B. Eine PVDF-Membran (Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland) wird auf Größe des Gels zugeschnitten, in Kathodenpuffer B eingelegt und auf die obersten Filterpapiere gelegt. Das Gel wird gemeinsam mit den Glasplatten aus der Elektrophoresekammer genommen, die zuoberst liegende Glasplatte gelöst, das Gel mit einem Skalpell vorsichtig zurechtgeschnitten, sodass das Sammelgel entfernt wird und allseits glatte Ränder entstehen.

Während dieser Zeit muss die Membran auf dem Filterpapier immer wieder mit Kathodenpuffer B benetzt werden, um nicht auszutrocknen. Das Gel wird deckungsgleich auf die Membran gelegt. Darauf wird eine Schicht aus drei mit Anodenpuffer C getränkten Papieren gelegt. Insgesamt ist darauf zu achten, dass Filterpapiere, Membran und Gel weitgehend gleich groß sind und deckungsgleich in der Blotkammer zu liegen kommen. Desweiteren wird notiert, wie die Belegung der Taschen stattgefunden hat und wie diese Belegung sich auf der Membran darstellt. Die Blotkammer wird für eine Stunde an eine Spannungsquelle mit 11 V angeschlossen. Durch die anliegende Spannung werden die im Gel gebundenen Proteine auf die PVDF-Membran transferiert.

3.2.9.9 Immundetektion

Benötigt werden:

- Waschpuffer (10x TBS, auf 1x verdünnt mit H₂O dest., dazu 0,1 % TWEEN 20)
- Blocking Reagent (Waschpuffer mit 5% Instant-Magermilch, z.B. 5 g Milchpulver auf 100 ml Waschpuffer)

- ECL (Luminol, Para-Hydroxycoumarin-Säure, 1M Tris, 30% H₂O₂, nach dem Protokoll “A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background” von Haan *et. al* [62])
- H₂O₂ 30%

Nach erfolgreichem Blottingvorgang beginnt die Immundetektion der gewünschten Proteine auf der PVDF-Membran. Zum praktischen Vorgehen: Der auf dem Gel sichtbare Standard wird mit Bleistift auf die darunter liegende Membran abgezeichnet. Nur so ist eine spätere Größenordnung des Zielproteins möglich. Die Membran wird aus der Blottingkammer entfernt und für zehn Minuten auf einem Schüttler in Waschpuffer gelegt. Dieser Waschschrift wird mit frischem Waschpuffer wiederholt. Anschließend wird eine unspezifische Bindung des Antikörpers durch vorherige Behandlung mit Blocking Reagent verhindert. Hierzu wird die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Reagent, einer 5%-igen Lösung aus Trockenmilchpulver und Waschpuffer auf dem Schüttler inkubiert.

Es kann nun die erste Antikörperdetektion stattfinden: die Art und Konzentration des Antikörpers richtet sich nach dem zu detektierenden Protein. Die Membran wird mit Blocking Reagent und Antikörper für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Auch eine anschließende Inkubation über Nacht bei +4°C ist möglich. Es schließen sich drei Waschschriffe mit Waschpuffer von je zehn Minuten an.

Dann wird die Membran mit dem Sekundärantikörper und in Blocking Reagent für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers und ist mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert. Nach der Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper schließen sich drei zehnminütige Waschschriffe an.

Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörperkonzentrationen:

- LDHA: 1:1000 (=10 µl Antikörper zu 10 ml Waschpuffer)
- Phospho-LDHA: 1:1000 (=10 µl Antikörper zu 10 ml Waschpuffer)
- LDHB 1:1000: (=10 µl Antikörper zu 10 ml Waschpuffer)
- Glut-1 1:2000: (=5 µl Antikörper zu 10 ml Waschpuffer)
- β-Aktin: 1:2000 (=5 µl Antikörper zu 10 ml Waschpuffer)
- Sekundärantikörper: 1:2500 (=4µl pro 10ml Waschpuffer)

Daraufhin wird die Membran für eine Minute mit 5 ml ECL-Substratlösung und 1,5 µl H₂O₂ inkubiert. Nach kurzem Abtropfen wird die Membran luftblasenfrei in Plastikfolie gefasst und in einer Kassette fixiert.

Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert in Anwesenheit

von H_2O_2 die Oxidation des in der ECL enthaltenen Luminols. Diese Reaktion kann durch das Auflegen eines speziellen Filmes sichtbar gemacht werden.

Der Film (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wird in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegt, die Kassette wird fest verschlossen. Verschiedene Expositionsdauern von wenigen Sekunden bis maximal 15 Minuten sind möglich. Nach Ende der Expositionsdauer wird der Film sofort in der Dunkelkammer entwickelt.

Je nach Vorhandensein und Stärke von Banden und insbesondere durch den Vergleich der Banden untereinander ist ein Rückschluss auf die Expression des gewünschten Proteins möglich. Zudem ist der Vergleich mit einem „Housekeeper“-Protein, in diesem Falle dem β -Aktin nötig. Im Idealfall sind die Banden des β -Aktins überall gleich stark ausgeprägt, so dass unterschiedlich starke Banden tatsächlich auf unterschiedlich starke Expression des Proteins rückschließen lassen und nicht auf eine unterschiedliche Gesamtproteinmenge. Zu diesem Zweck wurde die Proteinmenge im Vorfeld normiert, sodass jede Geltasche mit einer definierten Menge an Gesamtprotein beladen wird.

Nach der Entwicklung des Filmes wird die Membran dreimal für zehn Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Um β -Aktin oder ein anderes Protein nachzuweisen, muss die Membran gestrippt, also von beiden Antikörpern befreit werden. Dafür wird die Membran mit 1 ml Re-Blot Stocklösung (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und 9 ml H_2O dest. für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Es kann sich anschließend eine einstündige oder über Nacht stattfindende Inkubation mit Blocking Reagent und die Immundetektion mit einem weiteren Antikörper anschließen.

3.2.10 Statistische Auswertungen

Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichungen (\pm SD). Bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie ist von drei durchgeführten Experimenten ein repräsentatives Experiment dargestellt. Statistische Analysen wurden mit der Software Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Verwendet wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-test. Statistisch signifikante bzw. nicht signifikante Unterschiede werden folgendermaßen bezeichnet:

ns = nicht signifikant, $p \geq 0.05$, $*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$ und $***=p < 0.001$.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der LDHA

4.1.1 Nachweis der LDHA mittels RT-PCR

Mittels einer „short hairpin“ RNA wurde in Vorarbeiten in B16-Tumorzelllinien die LDHA herunterreguliert [63]. Verwendet wurden immortalisierte Mausmelanom-Zelllinien. Bevor Mausversuche mit diesen Tumorzellen *in vivo* durchgeführt werden können, um zu analysieren, inwieweit sich die Immuninfiltration in Abhängigkeit von der Lakatatsekretion verändert, sollten die Klone *in vitro* charakterisiert werden. Zunächst wurde die Expression der LDHA auf mRNA Ebene mittels RT-PCR (Real-Time-Polymerase-Chain Reaction) untersucht.

Es zeigte sich, dass die Expression der LDHA auf mRNA-Ebene bei den Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu den Lac^{hi}-Klonen signifikant erniedrigt war (Abb.4.1).

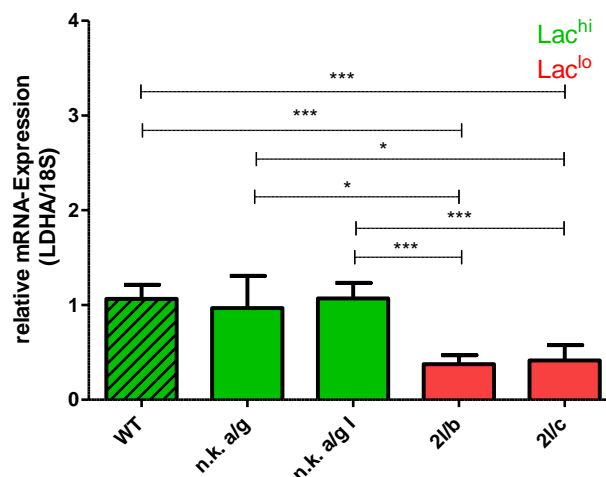


Abb. 4.1 Die Expression der LDHA auf mRNA-Ebene ist bei den Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu den Lac^{hi}-Klonen signifikant reduziert. Die Lac^{hi}-Klone WT (Wildtyp), n.k. a/g, n.k. a/g I und die Lac^{lo}-Klone 2 l/b und 2 l/c wurden für drei Tage kultiviert und anschließend lysiert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen LDHA/18S-Ratio. $n \geq 3$.

Das Isoenzym der LDHA, die LDHB, war bei den Lac^{lo}-Klonen in Bezug auf 18S signifikant höher exprimiert als bei den Lac^{hi}-Klonen (Abb 4.2).

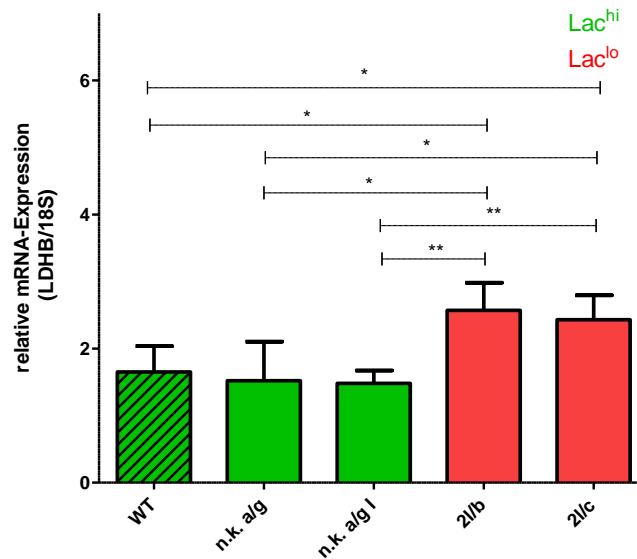


Abb. 4.2 Signifikant erhöhte Expression der LDHB bei Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu Lac^{hi}-Klonen. Die Lac^{hi}-Klone WT (Wildtyp), n.k. a/g, n.k. a/g I und die Lac^{lo}-Klone 2 l/b und 2 l/c wurden für drei Tage kultiviert und anschliessend lysiert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Verwendet wurden dieselben Lysate wie zum Nachweis der LDHA. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen LDHB/18S-Ratio. $n \geq 3$.

4.1.2 Expression der LDHA auf Proteinebene

Zusätzlich zum Nachweis einer reduzierten Genexpression der LDHA war der Nachweis der reduzierten Expression auf Proteinebene notwendig. Hierfür wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Es zeigten sich bei den Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu den Lac^{hi}-Klonen abgeschwächte Banden der LDHA (Abb. 4.3). Im Vorfeld des Western Blot wurde die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein auf 10 µg pro Geltasche eingestellt.

Die gleich starke Proteinbeladung wurde mit dem Nachweis gleich starker Banden des „Housekeeper“-Proteins β-Aktin verifiziert. Da die Phosphorylierung der LDHA die Aktivität reguliert, wurde auch die phosphorylierte LDHA (pLDHA) untersucht [64]. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen (Abb. 4.3)

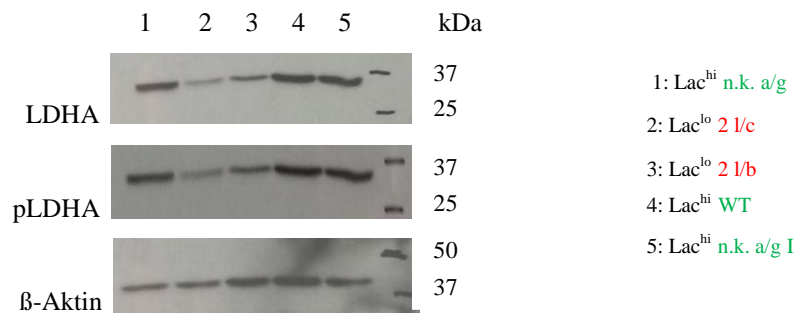


Abb. 4.3 Die LDHA-Expression auf Proteinebene ist bei den Lac^{lo}-Klonen geringer ausgeprägt als bei den Lac^{hi}-Klonen. Die Proteinlysate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und anschließend mittels Antikörper detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von Wildtyp (WT), den Lac^{hi}-Klonen n.k. a/g und n.k. a/g I und den Lac^{lo}-Klonen 2 l/b und 2 l/c. Die gleichartige Beladung an Gesamtprotein geht aus dem im Vergleich vorliegenden Western Blot des β -Aktins hervor. n = 3.

Die Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot zum Nachweis der LDHB zeigte im Einklang mit den Ergebnissen der RT-PCR, dass die Expression der LDHB auch auf Proteinebene unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abb. 4.4). Die Lac^{lo}-Klone zeigten eine stärkere Expression der LDHB.

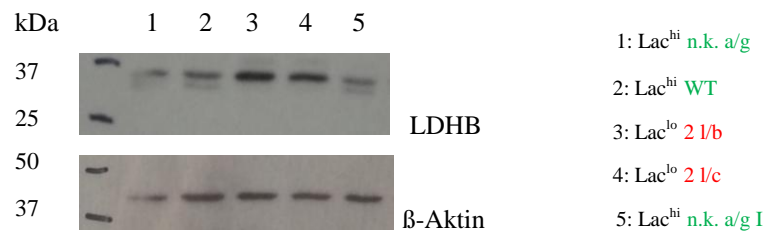


Abb. 4.4 Die LDHB-Expression auf Proteinebene ist bei den Lac^{lo}-Klonen stärker ausgeprägt als bei den Lac^{hi}-Klonen. Die Proteinlysate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und anschließend mittels Antikörper detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von Wildtyp (WT), den Lac^{hi}-Klonen n.k. a/g und n.k. a/g I und den Lac^{lo}-Klonen 2 l/b und 2 l/c. n = 3.

4.1.3 Reduzierte Laktatproduktion bei Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu den Lac^{hi}-Klonen

Da die mRNA bzw. Proteinexpression keine Aussage zur Enzymaktivität zulassen, wurden auch die entsprechenden Metabolite im Zellkulturüberstand analysiert. Die Zellen wurden hierfür in regelmäßigen Abständen während der Zellkultur unter immer denselben Bedingungen in 96-Well-Platten mit einer Konzentration von 125 000 Zellen/ml Medium inkubiert. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung die Laktatkonzentration im Medium ohne Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Laktatproduktion der untersuchten Lac^{lo}-Klone niedriger ist als die der Lac^{hi}-Klone. Berücksichtigt man, dass die Konzentration an Laktat

bereits bei den Mediumkontrollen konstant bei ca. 7mg/dl liegt, wird der Unterschied zwischen Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen deutlicher. Somit zeigte sich eine um ein Drittel bis um die Hälfte reduzierte Laktatproduktion bei den Lac^{lo}-Klonen. Die gerundeten Mittelwerte lagen bei den Lac^{hi}-Klonen bei 55 mg/dl (WT), 33 mg/dl (n.k. a/g), 46 mg/dl (n.k. a/g I) und 55 mg/dl (n.k. a/g 2). Die Lac^{lo}-Klone lagen bei 28 mg/dl (2l/b), 25 mg/dl (2l/c) und 31 mg/dl (2l/c. 5). Die Kontrollbehandlung mit scrambled RNA hatte nur einen geringen Einfluss auf die Laktatproduktion der Lac^{hi}-Klone. Alle miteinander verglichenen Paare aus Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen wiesen einen signifikanten Unterschied in der Laktatproduktion auf mit Ausnahme von n.k. a/g verglichen mit 2 l/b und 2 l/c. 5 (Abb. 4.5).

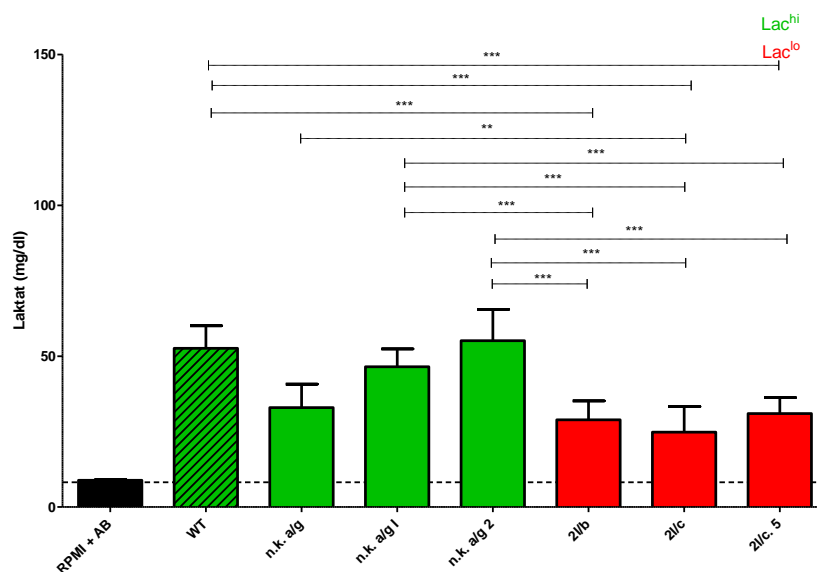


Abb. 4.5 Signifikant reduzierte Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand bei den Lac^{lo}-Klonen im Vergleich zu den Lac^{hi}-Klonen. Die Laktatkonzentrationen in den Überständen der Tumorzellen wurden bei 125 000 Zellen/ml in der 96-Well-Platte nach 24h gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von enzymbasierten spektrophotometrischen Laktatmessungen in den Zellkulturüberständen. RPMI + AB entspricht RPMI-Medium ohne Zellen mit Selektionsantibiotika Blasticidin und G418. n ≥ 8.

4.2 Charakterisierung von Wachstum, Stoffwechsel und Oberflächenexpression

4.2.1 Glukoseverbrauch

Tumorzellen weisen einen hohen Glukoseverbrauch auf. Die oxidative Phosphorylierung mit dem damit einhergehenden Sauerstoffverbrauch würde die Zellen mehr ATP gewinnen lassen, als dies mit Glykolyse und abschließender Laktatproduktion möglich wäre. Dennoch betreiben die Zellen die sogenannte „aerobe Glykolyse“; mit diesem Begriff wird die Glykolyse und Laktatproduktion trotz ausreichendem Sauerstoff in der Umgebung bezeichnet

[17]. Die in dieser Arbeit charakterisierten Tumorzellen unterschieden sich in der Menge ihrer Laktatproduktion. Jedoch kann generell bei Tumorzellen auch die glukogene Aminosäure Glutamin zur Laktatproduktion herangezogen werden [4,65]. Um zu demonstrieren, dass bei den hier charakterisierten Zellen ein gewisser Anteil des von den Tumorzellen produzierten Laktats aus Glukose gewonnen wurde, fand zusätzlich zu den Laktatmessungen die Messung von Glukosekonzentrationen in Zellkulturüberständen statt. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden, die Zellkonzentration lag bei 200 000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte.

Hierbei ging eine hohe Laktatproduktion stets mit einem Abfall der Glukose im Überstand einher (Abb.4.6). Die Lac^{hi}-Klone wiesen in den Zellkulturüberständen eine signifikant geringere Glukosekonzentration auf als die Lac^{lo}-Klone, somit haben die Lac^{hi}-Klone signifikant mehr Glukose verbraucht als die Lac^{lo}-Klone. Vom Wildtyp, von dem nur eine Messung im Zellkulturüberstand vorgenommen wurde, konnte keine Signifikanz berechnet werden. Bei den Klonen n.k. a/g und n.k. a/g I war der Unterschied im Vergleich zu 2l/b nicht signifikant, im Vergleich zu 2l/c und 2l/c. 5 war der Unterschied signifikant.

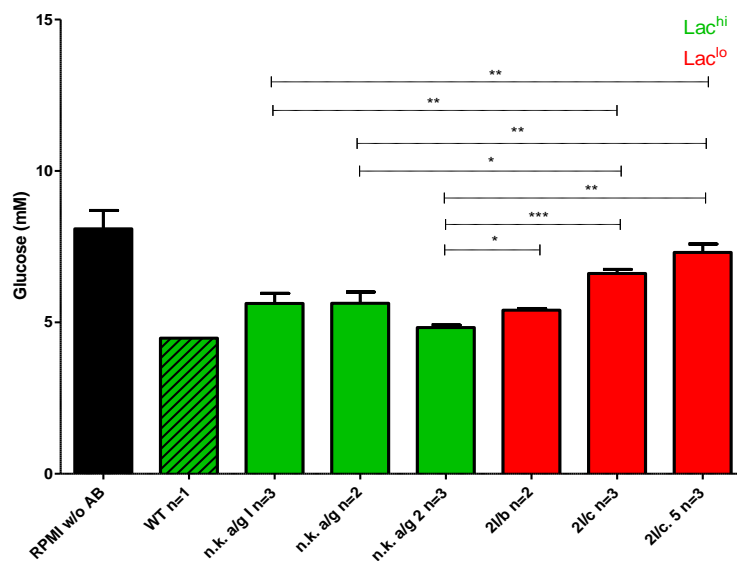


Abb. 4.6 Höherer Glukoseverbrauch von Lac^{hi}-Klonen im Vergleich zu Lac^{lo}-Klonen. Die Glukosekonzentrationen in den Überständen der Tumorzellen wurden bei 200 000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte nach 24h mittels Hexokinase-Assay-Kit gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Glukosekonzentrationen im Überstand. RPMI + AB entspricht RPMI-Medium mit Selektionsantibiotika Blasticidin und G418.

4.2.2 Proliferationsverhalten von Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen

Die Beurteilung der Proliferation der Zellen *in vitro* war wichtig, um zu entscheiden, ob die verminderte Laktatsekretion durch vermindertes Wachstum bedingt war. Ein gleiches Wachstum *in vitro* war zudem Grundvoraussetzung für die *in vivo* Versuche. Da das Tumorstadium von Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen im Vergleich beurteilt wurde, mussten für die *in*

in vivo-Versuche Zellen selektiert werden, die *in vitro* gleich stark proliferierten.

Die Messung des Proliferationsverhaltens erfolgte mit dem ^3H -Thymidinassay. Die Zellen wurden hierfür in einer Konzentration von 25 000 Zellen/Well und 5 Wells/Klon in 96-Well-Platten für 24 h inkubiert. Das Proliferationsverhalten der Klone war nicht vollkommen gleich: n.k. a/g und n.k. a/g 2 proliferierten signifikant weniger als 2 l/c und 2 l/c. 5. Beim Vergleich aller weiteren Klone ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.7). Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass ein Knockdown der LDHA in unserem Modell nicht zu einem Proliferationsstop führte, die Lac^{lo} -Klone proliferierten nicht generell weniger als die Lac^{hi} -Klone. Unter Einbeziehung der Laktatlevel heißt dies, dass die niedrige Laktatproduktion nicht auf eine geringere Proliferationsrate zurückzuführen war, also keinen „Proliferationseffekt“ widerspiegelt. Eine hohe Proliferationsrate ging nicht mit einer größeren Laktatproduktion einher. Besonders gut war dies am Klon 2 l/c. 5 erkennbar, welcher trotz sehr hoher Proliferationsraten eine geringe Laktatproduktion aufwies. Zur Interpretation des *in vivo* Wachstumsverhaltens der Klone lässt sich festhalten, dass n.k. a/g und n.k. a/g 2 zwar weniger proliferierten als 2 l/c und 2 l/c. 5, dass dieser Unterschied aber nicht besonders ausgeprägt war.

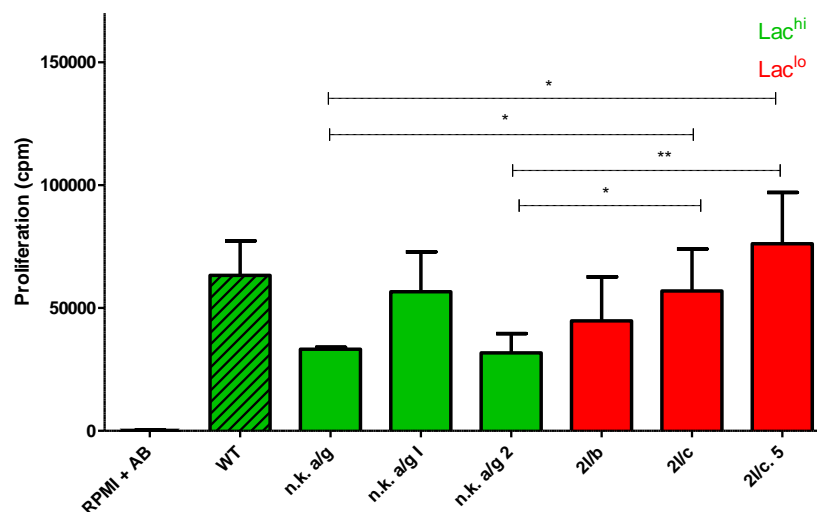


Abb. 4.7 Proliferationsraten der Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klone. Die Klone wurden in 96-Well-Platten mit 25 000 Zellen/Well für 24h inkubiert und anschliessend mittels ^3H -Thymidinassay auf ihre Proliferation untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse mindestens dreier unabhängiger Versuche. $n \geq 3$. RPMI + AB entspricht RPMI-Medium mit Selektionsantibiotika Blasticidin und G418.

4.2.3 Wachstum in Zellkultur von Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klonen im Vergleich

Analysierte man die Zellen unter den Bedingungen der Zellkultur in der 75 cm^2 -Flasche, so ließ dies eine bessere Annäherung an die Proliferationsbedingungen *in vivo* zu, da man hier

Wachstumstendenzen über einen längeren Zeitraum verfolgen konnte. Dafür wurde die Gesamtzellzahl in einer 75 cm²-Zellkulturflasche nach drei bzw. vier Tagen Zellkultur bestimmt. Die Ausgangszellzahl lag bei einer bzw. zwei Millionen Zellen. Es wurde darauf geachtet, dass auch nach Ablauf der drei bzw. vier Tage noch genug freie Fläche am Boden der Zellkulturflasche vorhanden war und dass der pH-assozierte Farbumschlag des RPMI-Mediums keine starke Azidose anzeigte. Damit wurde ausgeschlossen, dass die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel weniger proliferierten. Die im ³H-Thymidin-Proliferationsassay nach 24 Stunden gezeigten Wachstumstendenzen waren auch nach 3-4 Tagen nachweisbar: der Wildtyp und 2l/c. 5 wuchsen mehr als n.k. a/g oder n.k. a/g I, während 2l/b und n.k. a/g 2 vergleichsweise etwas weniger als die anderen Klone wuchsen (Abb. 4.8).

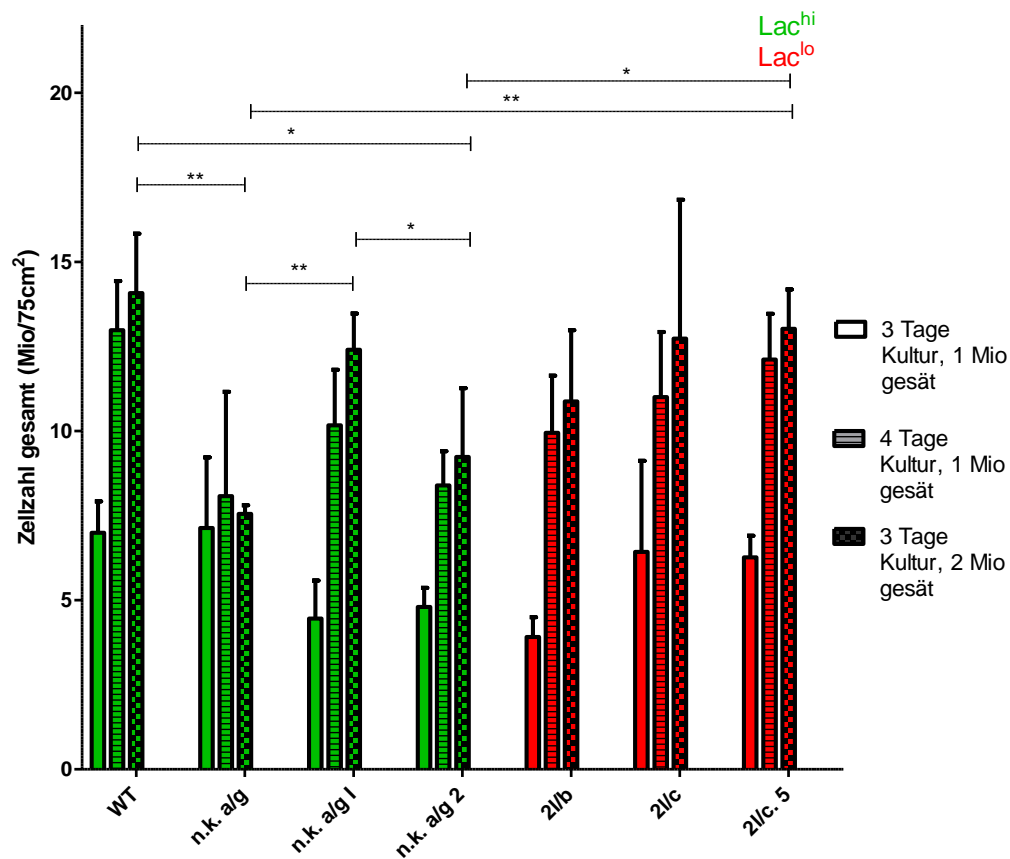


Abb. 4.8 Wachstum der Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone in Zellkultur. Während der Zellkultur wurde nach jeder Passage die Gesamtzellzahl mittels CASY gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtzellzahl der Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone in 75 cm²-Zellkulturflaschen nach 3 bzw. 4 Tagen Zellkultur und 1 Mio Zellen Ausgangswert (jeweils 1. und 2. Balken) und nach 3 Tagen Zellkultur und 2 Mio Zellen Ausgangswert (3. Balken). n_≥4, ausser n.k. a/g: n = 2.

Vor jeder Passage wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Tote Zellen, welche über dem Monolayer der adhären Zellen schwammen, waren vereinzelt nachzuweisen. Beurteilt wurde die Zellmorphologie anhand eines digitalen Mikroskops in zehn-, zwanzig- und

vierzigfacher Vergrößerung. Die zwanzigfache Vergrößerung ist im Folgenden dargestellt (Abb. 4.9).

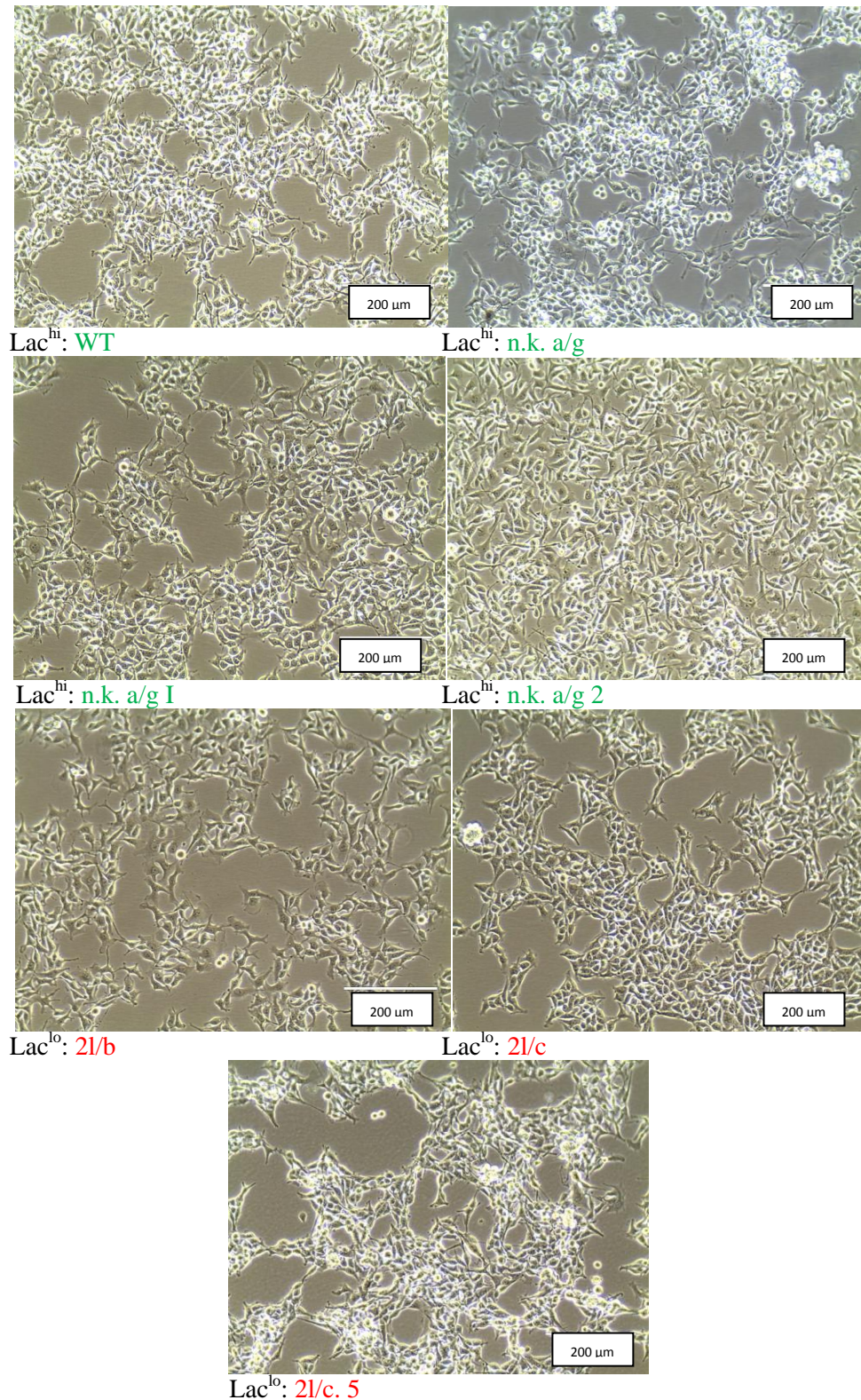


Abb. 4.9 Ähnliche Zellmorphologie bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen. Die charakterisierten Klone wurden in zwanzigfacher Vergrößerung mit einem digitalen Mikroskop aus der 75cm²-Zellkulturflasche nach 3-4 Tagen in Kultur fotografiert. Dargestellt sind repräsentative Fotografien der zwanzigfachen Vergrößerung.

Die Zellen wiesen während der Zellkultur stets einen konstanten durchschnittlichen Zelldurchmesser von ca. 16 μm und eine konstante Viabilität von etwa 88-92% lebenden Zellen auf (Abb. 4.10). Grundlage des Parameters „Viabilität“ war der Ausschluss toter Zellen mithilfe des CASY-Zellzählsystems. Dieses bestimmt neben der Zellkonzentration in einer bestimmten Zellsuspension auch die mittlere Größe und die Viabilität der Zellen. Grundlage für den „Messwert“ Viabilität waren hier für den Zelltyp individuell kalibrierte cut-off-Werte, die Zellschrott und kleine apoptotische Zellen anhand ihrer Größe von der Messung der Gesamtzellzahl viabler Zellen ausschließen.

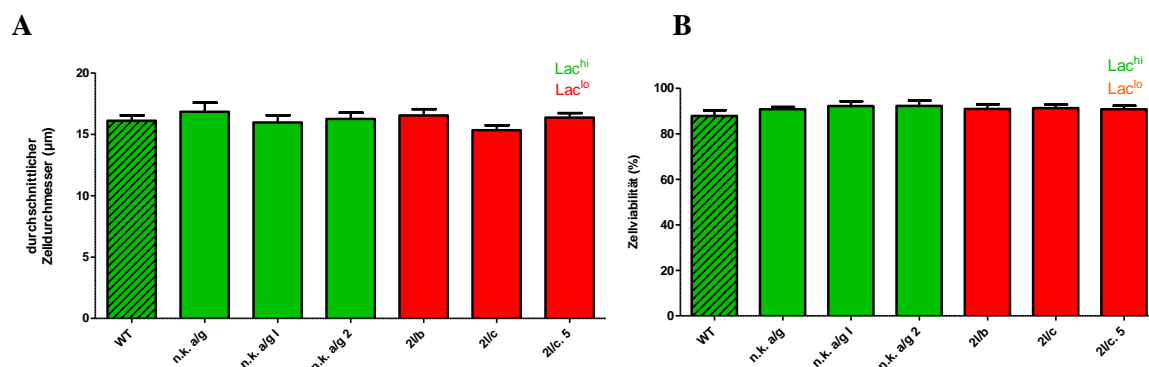


Abb. 4.10 A und B Gleiche Zellgröße und gleiche Zellviabilität der B16-Klone. Zellgröße (A) und –viabilität (B) wurden mit dem CASY-Zellzählsystem während der Passage der Zellen ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellgröße und Zellviabilität zum Zeitpunkt der Passage nach 3-4 Tagen in Zellkultur. $n \geq 8$.

4.2.4 Einfluss des Knockdowns der LDHA auf den Sauerstoffverbrauch

Wie die bisherigen Experimente zeigten, verhielten sich Lac^{lo}- und Lac^{hi}-Klone unterschiedlich bezüglich ihrer Glukoseaufnahme und Laktatsekretion. In diesem Zusammenhang stellte sich Frage, ob die Lac^{lo}-Klone zur Energiegewinnung wieder verstärkt die oxidative Phosphorylierung verwendeten und somit mehr Sauerstoff verbrauchten als die Lac^{hi}-Klone. Deshalb wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen gemessen.

Mittels der PreSens-Technologie wurde für 24h der Sauerstoffgehalt in einem abgeschlossenen System, in welchem die Zellen inkubiert wurden, gemessen und daraus Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen gezogen. Bei humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien und humanen Lymphom-Zelllinien wurde gezeigt, dass ein siRNA-Knockdown der LDHA zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch führt [16]. Auch in unserem Modell verbrauchten die Lac^{lo}-Klone mehr Sauerstoff als die Lac^{hi}-Klone. Der Unterschied ist im Vergleich jedes Lac^{hi}-Klons mit jedem Lac^{lo}-Klon jedoch nicht immer signifikant. Der Lac^{lo}-Klon 2l/b verbrauchte signifikant mehr Sauerstoff als die Lac^{hi}-Klone.

2 l/c. 5 verbrauchte mehr Sauerstoff als n.k. a/g. Die anderen miteinander verglichenen Klone unterschieden sich zwar nicht signifikant bezüglich des Sauerstoffverbrauchs, unter Berücksichtigung der Durchschnittswerte darf jedoch von einer Tendenz hin zu einem höheren Sauerstoffverbrauch bei den Lac^{lo}-Klonen gesprochen werden (Abb. 4.11 A und B).

A

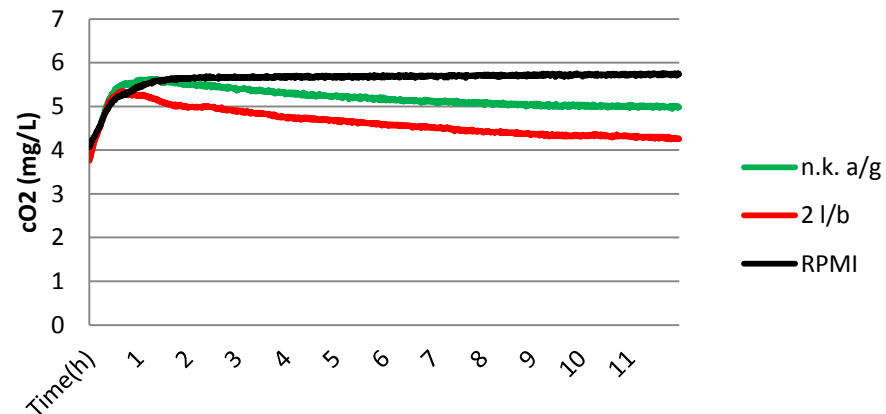


Abb. 4.11 A Lac^{lo}-Klon 2 l/b verbraucht mehr Sauerstoff als der Lac^{hi}-Klon n.k. a/g. Mittels der PreSens-Technologie wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium bei 200 000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte und 12h Inkubationszeit bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis eines Versuchsdatums. Hier gezeigt sind die Konzentrationen von O₂ über 12 h in je einem Well mit RPMI ohne Zellen, mit dem Lac^{hi}-Klon n.k. a/g und dem Lac^{lo}-Klon 2 l/b.

B

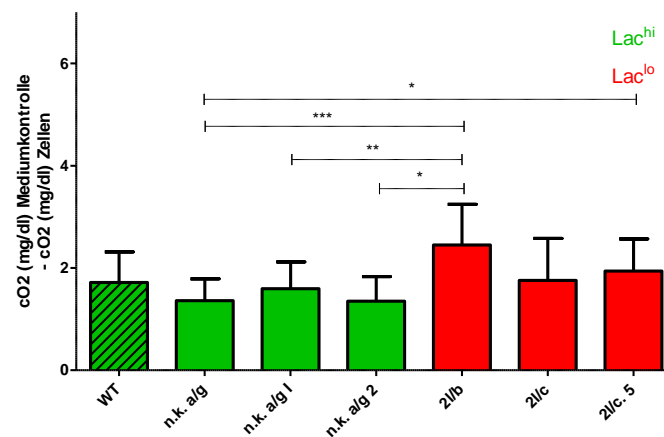


Abb. 4.11 B Lac^{lo}-Klone verbrauchen mehr Sauerstoff als Lac^{hi}-Klone. Mittels der PreSens-Technologie wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium bei 200 000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte und 12h Inkubationszeit in einem abgeschlossenen System bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des O₂-Verbrauchs der B16-Klone. Die Werte für den Verbrauch wurden ermittelt als Differenzen in der Sauerstoffkonzentration zwischen Wells mit Mediumkontrolle und Wells mit Zellen. Gezeigt wird das Ergebnis von drei Versuchstagen, an denen jeweils 2 Wells angesetzt wurden. Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der somit insgesamt sechs angesetzten Wells gleicher Behandlung voneinander. n = 6 (außer WT: n = 3).

4.2.5 Messung weiterer Stoffwechselparameter auf mRNA-Ebene

Um auszuschließen, dass bestimmte Effekte in den *in vivo*-Experimenten auf eine veränderte Konzentration anderer im Tumorstoffwechsel wichtiger Parameter zurückzuführen waren, wurde eine Analyse einiger Parameter auf mRNA-Ebene durchgeführt. Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist Gegenstand intensiver Forschung, da es bei verschiedenen Tumoren in erhöhter Konzentration nachweisbar ist. Bei den untersuchten B16-Klonen konnten die Isoformen IDO1 und IDO2 nicht nachgewiesen werden. Auch das Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels, die Cyclooxygenase in den Isoformen 1 und 2 konnten bei den B16-Klonen nicht nachgewiesen werden. Auch das Ergebnis bezüglich der Untersuchung auf Arginase_1 und 2 fiel negativ aus. Das „Monocyte Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1) sowie die immunmodulatorischen Zytokine TNF und Interleukin-10 konnten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Anders verhält es sich mit TGF- β . Dieses Zytokin ist auf mRNA-Ebene bei den Klonen nachweisbar. Die mRNA-Expression von TGF- β ist bei den Lac^{lo}-Klonen signifikant niedriger als bei den Lac^{hi}-Klonen (Abb. 4. 12 a).

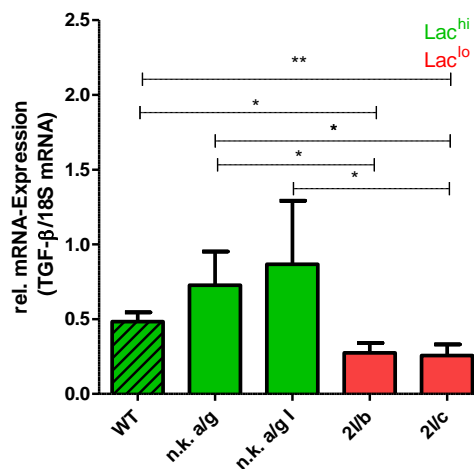


Abb. 4.12 a Die TGF- β Expression ist bei den Lac^{lo}-Klonen geringer als bei den Lac^{hi}-Klonen Die Lac^{hi}-Klone WT (Wildtyp), n.k. a/g, n.k. a/g I und die Lac^{lo}-Klone 2 l/b und 2 l/c wurden für drei Tage kultiviert und anschließend lysiert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen TGF- β /18S-Ratio. $n \geq 3$, außer n.k. a/g und n.k. a/g I: $n = 2$.

Zudem wurden weitere Enzyme der Glykolyse untersucht, da ausgeschlossen werden sollte, dass diese glykolytischen Enzyme in ihrer mRNA-Expression durch den Knockdown der LDHA moduliert wurden. Hierzu wurden Glut-1, Hexokinase 1 und Hexokinase 2 untersucht. Verwendet wurden dieselben Lysate wie bei der Bestimmung von LDHA und LDHB mit einer Zellkonzentration von 1 Mio Zellen/2 ml Medium in der 6-Well-Platte.

Zusätzlich wurde die Expression des Glukosetransporters Glut-1 auf Proteinebene untersucht. Hierbei zeigte sich eine gleichartige Expression von Glut-1 bei den Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen (Abb. 4.12 b und c). Obwohl die Expression der Enzyme nicht in allen Klonen gleich stark ausgeprägt ist, darf man die Aussage treffen, dass der Knockdown der LDHA keine oder nur geringe Änderungen der RNA-Expression von Glut-1, Hexokinase 1 und Hexokinase 2 zur Folge hatte (Abb. 4.12 b A-C).

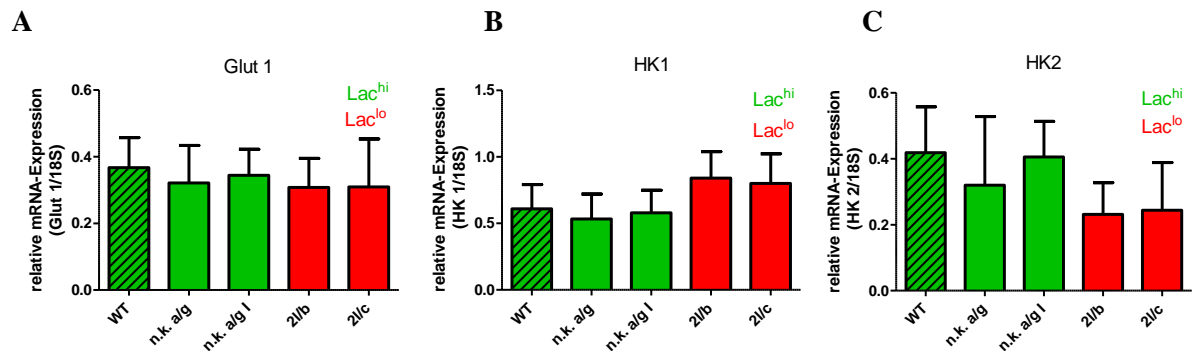


Abb. 4.12 b Gleich starke Expression von Glut-1, Hexokinase1 und 2 auf mRNA-Ebene. Die mRNA-Expression von Glut-1 (A), Hexokinase 1 (B) oder Hexokinase 2 (C) bezogen auf die Expression der jeweiligen 18S mRNA wurde untersucht. Die Klone wurden für drei Tage kultiviert und anschliessend lysiert. Die RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Glut-1 oder HK1 oder HK 2/18S-Ratio. $n \geq 3$.

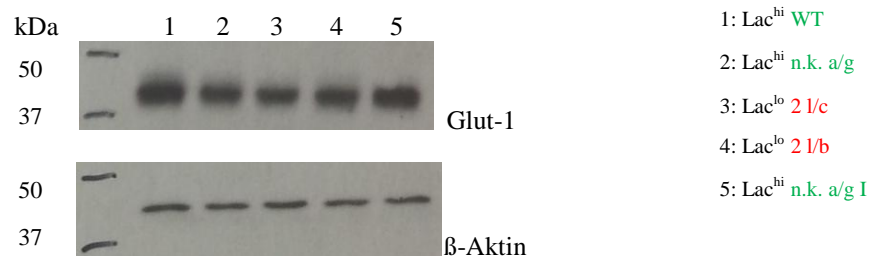


Abb. 4.12 c Glut-1 ist auf Proteinebene bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen gleich stark exprimiert. Die Proteinlysate wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und anschließend mittels Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von Wildtyp (WT) und zwei Lac^{hi}- und zwei Lac^{lo}-Klonen.

4.2.6 Durchflusszytometrische Beurteilung bestimmter Oberflächenmarker

Das Ziel der Charakterisierung von Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen war es, eine Grundlage für *in vivo* Versuche zu schaffen. Hierbei sollten Klone injiziert werden, die sich nicht im Hinblick auf Proliferation oder Oberflächen- bzw. intrazellulären Markern unterschieden, sondern nur hinsichtlich ihrer Laktatsekretion. Da geplant ist, die Immunantwort auf die Klone zu untersuchen, sollte die Expression der Oberflächenmoleküle H2Kb und Iab, welche für die Antigenexpression essentiell sind, sowie die Expression von PD-L1 analysiert werden. Ausserdem wurde CD44, das wichtig für Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion und Migration ist, untersucht. Desweiteren erfolgte eine Messung des Proliferationsmarkers Ki-67.

Iab entspricht im murinen System dem menschlichen Major Histocompatibility Complex II, kurz MHC-II. Es befindet sich auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort: hier ist es beteiligt an der Oberflächenpräsentation von intrazellulär prozessierten körperfremden Antigenen wie Viren, Bakterien oder Parasiten oder auch von Tumorantigenen. Zudem vermittelt es die folgende Zell-Zell-Kommunikation zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen [66]. Die Rolle der MHC-II Expression von Tumorzellen wird seit einiger Zeit mit den verschiedensten humanen und murinen Tumorzellen erforscht. Warum viele Tumore MHC-II exprimieren, obwohl sie herkömmlicherweise keine antigenpräsentierenden Zellen sind, ist noch nicht endgültig geklärt [67]. Im Zusammenhang mit der Immuninfiltration bei *in vivo* Versuchen ist Iab bzw. H2Kb wichtig, da beide Moleküle eine Schlüsselrolle bei Erkennung und Aktivierung von T-Zellen in der Immunantwort auf Tumore spielen. Iab spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, H2Kb bei der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen [67]. In unserem Fall wurde untersucht, ob die Iab-Expression des verwendeten Lac^{hi}-Klons sich von der Expression des Lac^{lo}-Klons unterscheidet. Im Falle einer gleich starken Iab-Expression kann dies als weiterer Baustein gelten, dass nicht die unterschiedliche Expression von immunmodulatorischen Oberflächenmolekülen sondern das Laktat ausschlaggebend für eine unterschiedliche Immuninfiltration ist.

Iab war auf jedem der untersuchten Klone schwach exprimiert, jedoch nicht bei der vollständigen Population, sondern nur bei einem Teil der Zellen (Abb. 4.13).

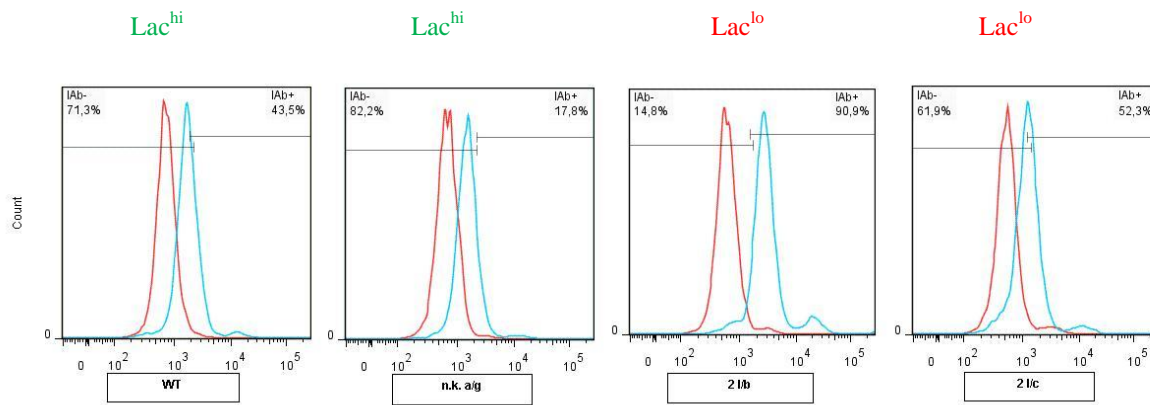


Abb. 4.13 Expression von Iab auf der Oberfläche der B16-Klone. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend mit Isotyp (rot) oder Antikörper gegen Iab (blau) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

H2Kb im murinen System entspricht dem menschlichen MHC-I und ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert [66]. Gekoppelt an MHC-I werden körpereigene Antigene an der Zelloberfläche präsentiert. Obwohl es sich bei Tumorzellen um Abkömmlinge nicht entarteter Zellen handelt, ist MHC-I bei manchen Tumorarten nicht auf der Oberfläche exprimiert, was zu einer fehlerhaften Präsentation tumoreigener Antigene führt. Somit können die Tumorzellen nicht vom Immunsystem als körperfremd oder entartet erkannt und beseitigt werden [68]. Eine fehlende MHC-I Expression kann somit als „Immune Escape Mechanismus“ bestimmter Tumore bezeichnet werden [69].

Interessanterweise war H2Kb auf der Oberfläche sowohl der Lac^{hi}- als auch der Lac^{lo}-Klone nicht exprimiert (Abb. 4.14).

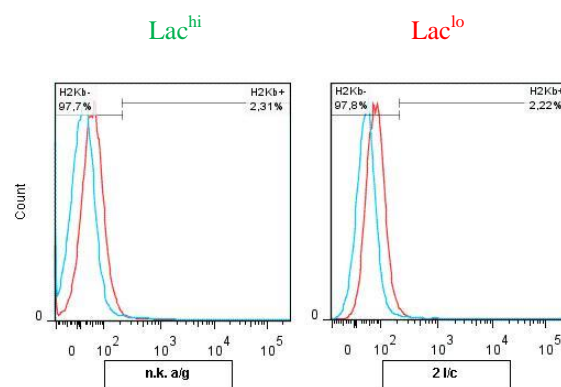
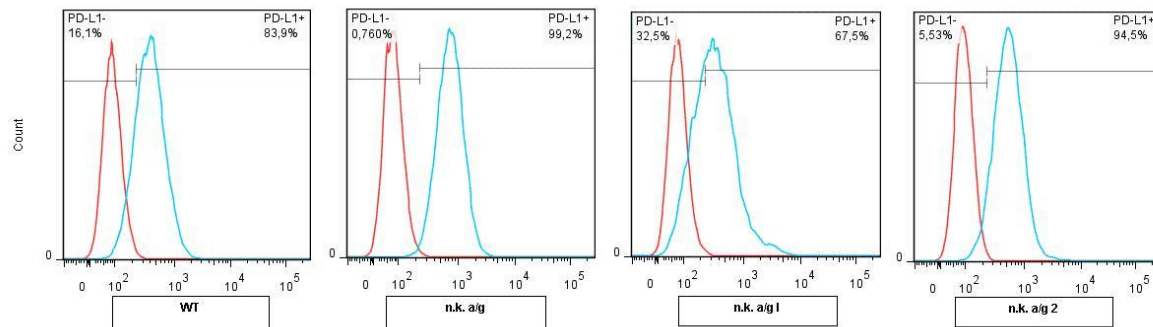


Abb. 4.14 Keine konstitutive Expression von H2Kb auf der Oberfläche der B16-Klone. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend mit Isotyp (rot) oder Antikörper gegen Iab (blau) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt werden zwei Klone eines repräsentativen Experiments von insgesamt drei durchgeführten Experimenten mit gleichem Ergebnis.

Bindet Programmed-death-Ligand 1 (PD-L1) auf Tumorzellen an PD 1 auf T-Zellen, so hemmt dies aktivierte CD8⁺ T-Zellen in ihrer Proliferation [70]. Es sendet somit ein immunsuppressives Signal aus und stört die Immunantwort gegen Tumorzellen.

PD-L1 war auf einem Großteil (67-99%) der untersuchten Tumorzellen konstitutiv exprimiert (Abb 4.15).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

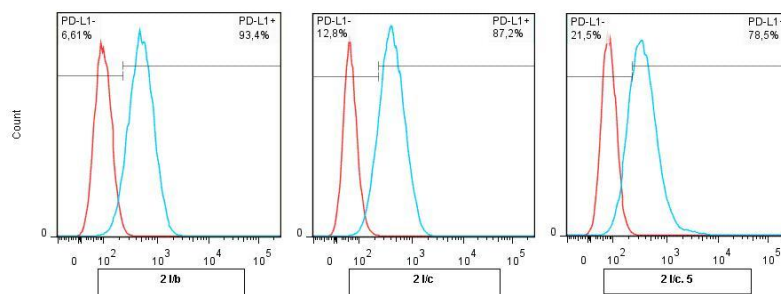
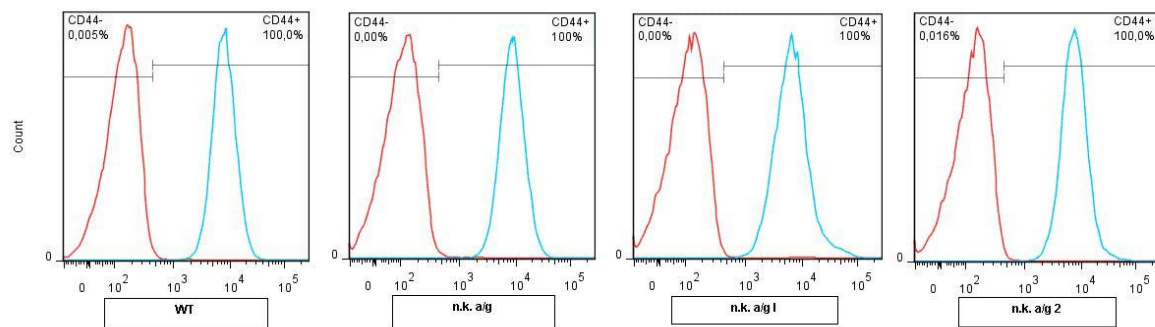


Abb. 4.15 Expression von Programmed death-Ligand 1 (PD-L) auf den Klonen. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend mit Isotyp (rot) oder Antikörper gegen Iab (blau) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

Weiterhin wurde die Expression von CD44 auf Tumorzellen untersucht. CD44 spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Zell Interaktion, Migration und Zelladhäsion [71]. CD44 war auf der Zelloberfläche aller untersuchten Klone konstitutiv exprimiert (Abb. 4.16).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

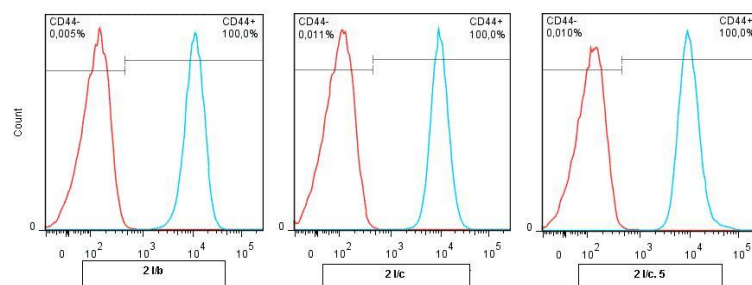
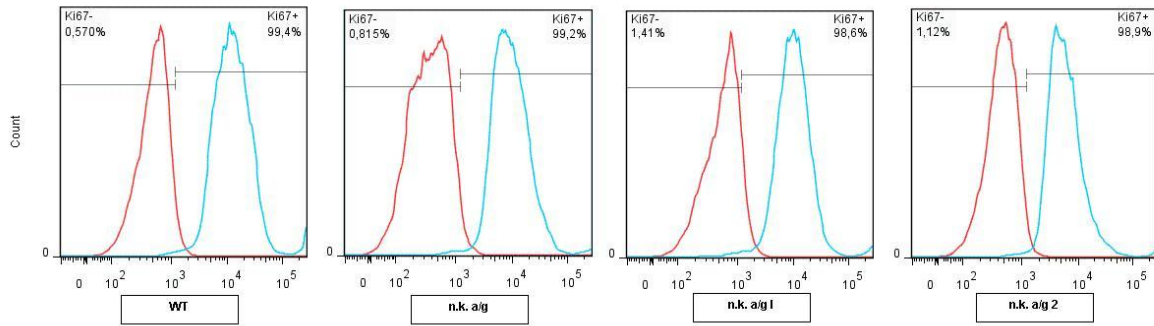


Abb. 4.16 Expression von CD44 auf der Oberfläche der B16-Klone. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend mit Isotyp (rot) oder Antikörper gegen IaB (blau) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

Bei Ki-67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker [72]. Er war mittels Intrazellulärfärbung nachweisbar. Der Anteil der Ki-67 positiven Zellen lag bei allen Klonen bei über neunzig Prozent. Diese Untersuchung diente als Ergänzung zum ³H-Thymidin-Proliferationsassay (Abb. 4.17).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

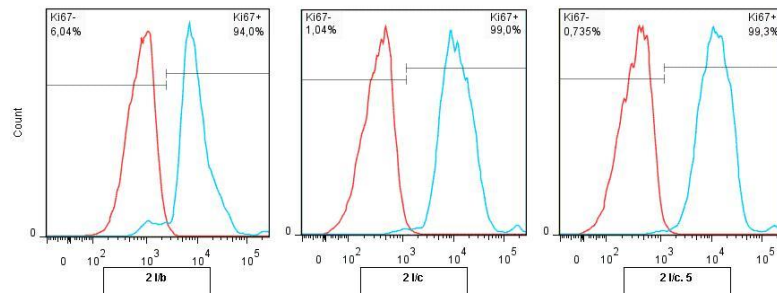


Abb. 4.17 Gleiche Expression von Ki-67 in den Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend mit Isotyp (rot) oder Antikörper gegen Iab (blau) gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

4.3 Einfluss des Tumormilieus

4.3.1 Verhalten der Klone unter Hypoxie

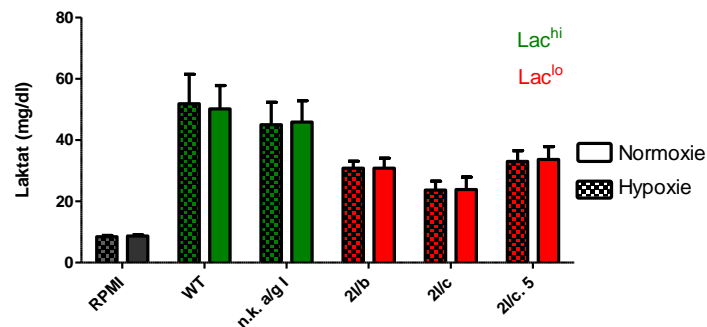
4.3.1.1 Hypoxieschrank

In der Medizin bezeichnet der Begriff Hypoxie den Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes unter 70 mmHg. Die weiter gefasste Definition beschreibt die Hypoxie als eine Minderversorgung eines Gewebes, Organs oder des ganzen Körpers mit Sauerstoff. Solide Tumore sind oft hypoxischen Bedingungen ausgesetzt: Ursache ist das schnelle Tumorstadium im Vergleich zur Gefäßneubildung im Tumorgewebe. Durch die unzureichende Gefäßversorgung können Engpässe in der Sauerstoffversorgung entstehen. In unserem Modell wurden Zellklone verwendet, die eine unterschiedliche Expression der LDHA zeigten und somit je nach Expressionslevel wieder verstärkt auf die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung umstellten (vgl. 4.2.4). Experimentell wurde daher versucht, den Einfluss von Hypoxie auf die verschiedenen Klone zu analysieren. Hierzu wurden die Klone in einem speziellen Brutschrank mit 1% statt den üblichen 20% Sauerstoff inkubiert. Die Zellen wurden in derselben Weise wie für die bisherigen Proliferations- und Laktatmessungen vorbereitet. Die Zellzahl wurde auf 125 000 Zellen/ml Medium

entsprechend 25 000 Zellen/Well in der 96-Well-Platte eingestellt. Die Laktat- und Proliferationsansätze wurden für 24 Stunden im Hypoxieschrank bzw. normalem Brutschrank inkubiert. Die Laktatüberstände wurden wie zuvor beschrieben abgenommen.

Es stellte sich die Frage, ob die Klone durch Hypoxie die Glykolyse weiter steigern können, wodurch ein Anstieg des Laktatlevels auftreten würde. Von Interesse war insbesondere die Reaktion der Lac^{lo}-Klone mit niedrigerer LDHA Expression, da ihnen nur noch begrenzt die Möglichkeit der aeroben Glykolyse mit Laktatproduktion zur Verfügung stand. Überraschenderweise führte die Inkubation im Hypoxieschrank zu keinen Unterschieden in Laktatproduktion und Proliferation (Abb. 4.18 A und B). Eine Reduktion der Sauerstoffumgebungskonzentration von 20% auf 1% führte demnach zu keinerlei Unterschieden bezüglich Laktatproduktion und Proliferation.

A



B

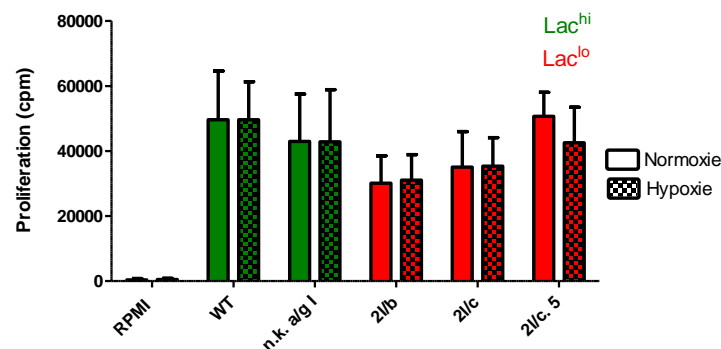


Abb. 4.18 A und B Kein Einfluss von 1% Umgebungssauerstoff auf Laktat im Zellkulturüberstand (A) und Proliferation im ³H-Thymidinassay (B). Die Zellen wurden für 24 h im Hypoxiebrutschrank inkubiert. Die Laktatkonzentrationen wurden mittels eines enzymbasierten, photospektrometrischen Tests ermittelt, die Proliferationen mittels ³H-Thymidinassay. Die Zellkonzentration betrug 125 000 Zellen/ml in der 96-Well-Platte. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand und der Ergebnisse des ³H-Thymidinassay. n=3.

4.3.1.2 Chemische Hypoxie

Neben der Erzeugung einer Hypoxie durch Herabsetzung der Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft besteht auch die Möglichkeit, die Zellen unter chemische Hypoxie zu setzen. Zwei Agenzien wurden hierfür in getrennten Versuchsansätzen verwendet: Der Eisenchelator 2,2'Dipyridyl (DP) und der HIF1-Stabilisator Deferoxamin (DFX). HIF1 α ist ein Transkriptionsfaktor und wird in vielen Tumoren durch Hypoxie induziert; HIF reguliert die Transkription vieler glykolytischer Enzyme [73]. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob eine HIF-Stabilisation mit DFX eine Erhöhung der Laktatproduktion zufolge hat. Ebenso wurde untersucht, ob DP zur Steigerung der Laktatproduktion führt, da DP durch die Bindung zweiwertigen Eisens die Atmungskette in ihrer Funktion beeinträchtigt. Zueiwertiges Eisen wird in der Atmungskette von mehreren Cytochrom-Enzymkomplexen benötigt. Eine Funktionseinschränkung in der Atmungskette kann zu gesteigerter anaerober Glykolyse mit Steigerung der Laktatproduktion führen. Für die Versuche wurden die Zellen in der 24-Well-Platte mit einer Konzentration von 125000 Zellen/Well inkubiert und mit 1 mM DFX oder 90 μ M DP versetzt.

Mehrere Parameter wurden bei den Zellen bestimmt: Zum einen wurde mittels CASY die Gesamtzahl der Zellen bestimmt, welche aus den ursprünglich ausgesäten 125 000 Zellen in jedem Well der 24-Well-Platte entstanden sind. Begleitend wurde am CASY die Viabilität der Zellen bestimmt. Zum anderen wurde die Laktatkonzentration im Überstand desselben Ansatzes gemessen. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl unter DP- als auch unter DFX-Behandlung das Wachstum der Zellen inhibiert wurde: Aus 125 000 Zellen entstanden deutlich weniger Zellen, wenn diese unter dem Einfluss chemischer Hypoxie standen. Der Effekt war bei 24 Stunden Inkubation bereits nachweisbar, jedoch nach 48 Stunden besonders deutlich. Die chemische Hypoxie hatte einen Wachstumsstop zufolge, da unter DP- oder DFX-Einfluss signifikant weniger Zellen aus den anfänglichen 125 000 entstanden waren als unter Kontrollbedingungen entsprechend der normalen Inkubation mit RPMI. Nur beim Klon n.k. a/g war dieser Unterschied nicht signifikant. (Abb. 4.19 a).

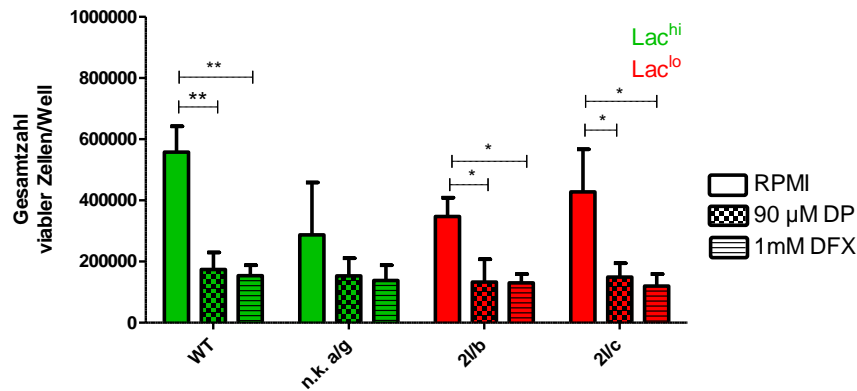


Abb. 4.19 a Abgeschwächtes Wachstum von Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klonen nach 48h chemischer Hypoxie. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtzahl an lebenden Zellen, welche in einem Well in der 24-Well-Platte aus 125000 lebenden Zellen nach 48h entstanden sind; die Zellzahl wurde ermittelt durch CASY. n=3.

Neben dem Wachstumsverhalten wurde als weiterer Parameter die Laktatproduktion untersucht: Hierfür erfolgte die Messung der Laktatkonzentration im Überstand. Weder die Behandlung mit DFX noch die mit DP führte zu einer veränderten Laktatproduktion. Dies ist erstaunlich, wenn man die geringere Proliferation unter der Behandlung mit DFX und DP berücksichtigt (Abb. 4.19 b).

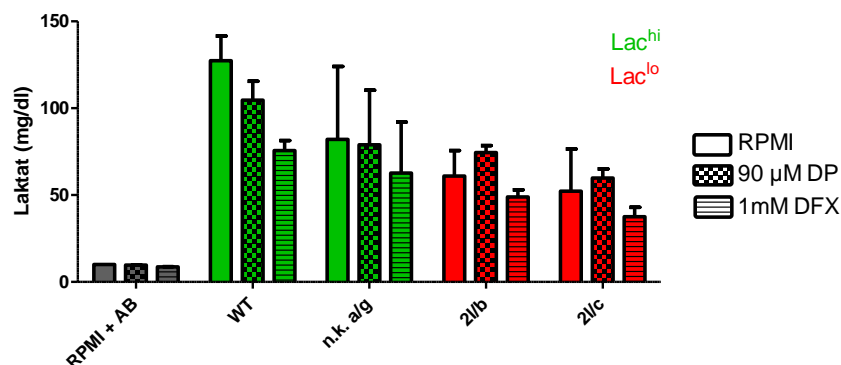


Abb. 4.19 b Gleiche Laktatproduktion bei Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klonen unter 48h Chemischer Hypoxie. Die Laktatkonzentrationen wurden im Überstand mittels eines enzymbasierten photospektrometrischen Tests ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Laktatkonzentration im Überstand mit 125000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte und 48h Inkubationszeit mit DP, DFX und der Kontrollbehandlung mit RPMI. n=3.

Somit wurde berechnet, inwieweit sich die Laktatmenge bezogen auf die Anzahl der lebenden Zellen verändert. Gezeigt ist die Menge an Laktat pro lebende 100 000 Zellen im Well unter dem Einfluss von RPMI (Kontrollgruppe), 90 µM DP. Bereits nach 24 Stunden zeigte sich, dass die Zellen unter dem Einfluss von DP die Laktatproduktion hochregulierten (Abb. 4.19 c).

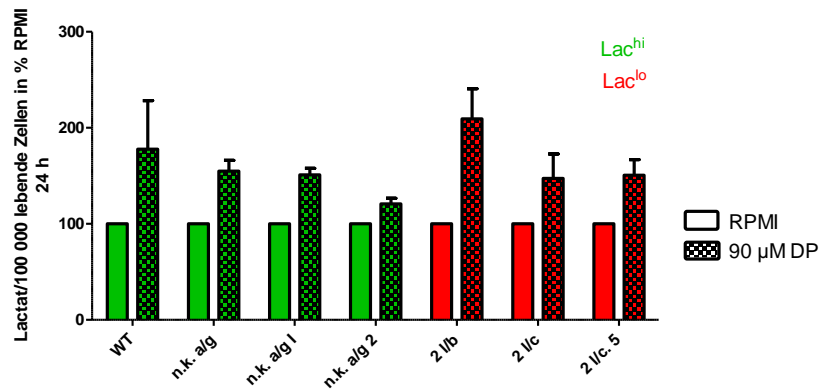


Abb. 4.19.c Gesteigerte Laktatproduktion unter dem Einfluss von DP bezogen auf die Anzahl lebender Zellen. Die Zellen wurden 24h in 24-Well-Platten in RPMI mit oder ohne 90 µM DP kultiviert. Die Laktatkonzentrationen wurden im Überstand mittels eines enzymbasierten photospektrometrischen Tests ermittelt. Die viablen Zellen wurden mittels CASY gezählt. Gezeigt ist das Verhältnis Laktat im Überstand/100 000 lebende Zellen; die Kontrollgruppe in RPMI wurde auf 100% normiert. n=2.

Nach 48 Stunden war dieser Unterschied deutlicher zu sehen: Auch hier führte die Behandlung mit DP zu einer gesteigerten Laktatproduktion; signifikant war dieser Unterschied bei 2 l/c. Zusätzlich wurde der Einfluss von DFX auf die Laktatproduktion untersucht. Die Behandlung mit DFX führte zu einer signifikant gesteigerten Laktatproduktion bei allen Klonen außer n.k. a/g. Gezeigt ist im Folgenden das Verhältnis des Laktats im Überstand zur Anzahl lebender Zellen, welche im selben Well mittels CASY gezählt wurden. Sowohl DP als auch DFX führten dazu, dass dieselbe Anzahl an Zellen im Verhältnis mehr Laktat produzierte. (Abb. 4.19 d).

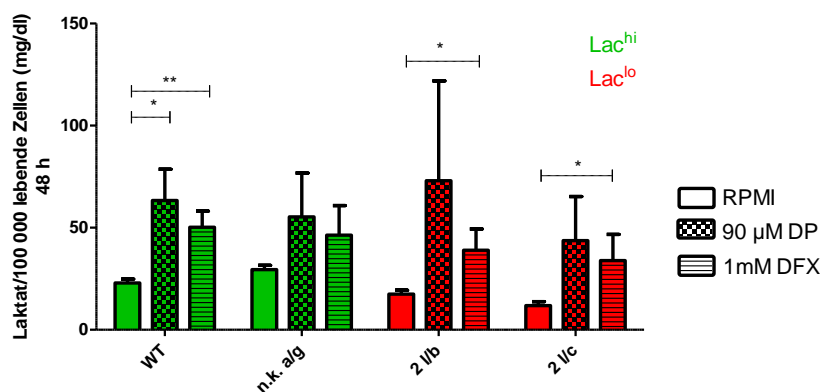


Abb. 4.19 d Steigerung der Laktatproduktion unter 48h 90 µM DP und 1 mM DFX. Die Zellen wurden 48 h in 24-Well-Platten mit einer Konzentration von 125 000 Zellen/Well mit RPMI ohne chemische Hypoxie (Kontrollgruppe), RPMI mit DP oder RPMI mit DFX inkubiert. Die Laktatkonzentrationen wurden im Überstand mittels eines enzymbasierten photospektrometrischen Tests ermittelt. Die viablen Zellen wurden mittels CASY gezählt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des Verhältnisses Laktat im Überstand/100 000 lebende Zellen. n=3.

Begleitend konnte gezeigt werden, dass sich unter der chemischen Hypoxie prozentual weniger lebende Zellen im Well befanden. Deshalb wurde die Viabilität mittels CASY analysiert. Die Behandlung mit DP oder DFX reduziert die Viabilität der Zellen: Nach 48 Stunden Inkubationszeit lag der Anteil lebender Zellen in den Kontrollen bei ca. 90%. Unter DP und DFX-Behandlung sank der Anteil lebender Zellen ab. Bei Lac^{hi}-Klonen lebten unter chemischer Hypoxie noch etwa 65% der Zellen, bei den Lac^{lo}-Klonen noch etwa 80 %. Die Zellviabilitäten unter DP-, DFX- oder Kontrollbehandlung unterschieden sich signifikant voneinander (Abb. 4.19 e).

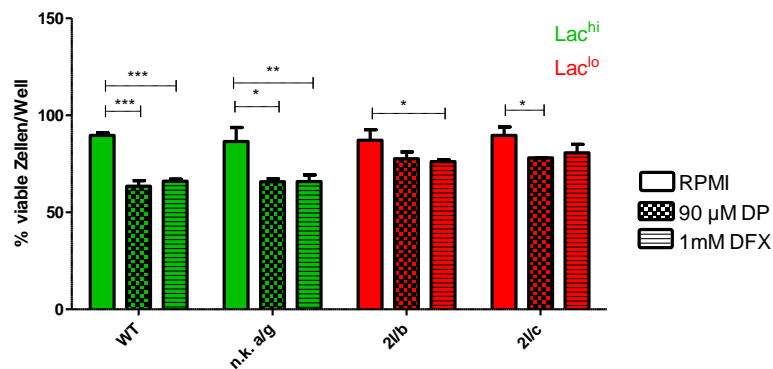


Abb. 4.19 e Reduktion der Zellviabilität unter chemischer Hypoxie. Gezeigt ist der mittels CASY bestimmte prozentuale Anteil der lebenden Zellen im Well unter Kontrollbedingungen, 90 µM DP und 1 mM DFX. Die Zellen wurden 48 h in 24-Well-Platten mit einer Konzentration von 125 000 Zellen/Well mit RPMI ohne chemische Hypoxie (Kontrollgruppe), RPMI mit DP oder RPMI mit DFX inkubiert. Der prozentuale Anteil der viablen Zellen wurde mittels CASY gemessen. Dargestellt sind hiervon die Durchschnittswerte und Standardabweichungen. n=3.

Zusätzlich wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung mit Annexin-V und 7AAD durchgeführt. Annexin-V⁺7AAD⁺ Zellen stellen in Apoptose gegangene tote Zellen dar. Hierfür wurden die Zellen mit DP behandelt und nach 48 Stunden Inkubationszeit gefärbt. Es zeigte sich eine Reduktion der viablen Annexin-V- und 7AAD-negativen Zellen bei allen untersuchten Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen; diese Reduktion der Zellviabilität war nicht signifikant. Dies bestätigte die Ergebnisse zur Viabilitätsprüfung mittels CASY wie in Abb. 4.19 e gezeigt. Zusätzlich gezeigt ist in diesem Fall die auch in jedem der ab 4.3. beschriebenen Versuche mitgeführte Kontrollgruppe mit EtOH, da DP in EtOH gelöst ist. Es zeigten sich in keinem Versuch Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen mit EtOH und RPMI (Abb. 4.19 f).

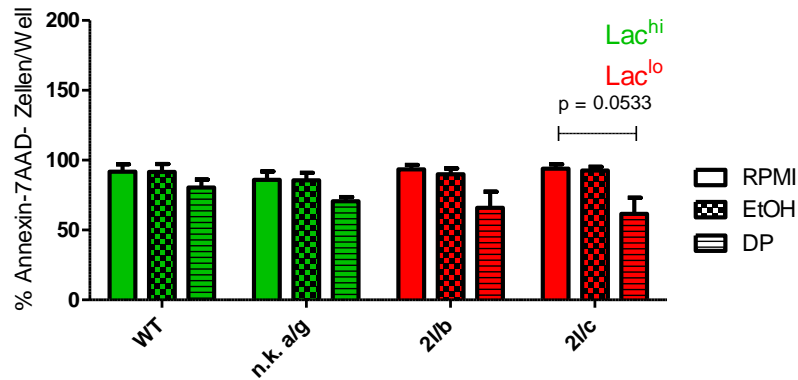


Abb. 4.19 f Apoptoseinduktion durch 48h chemische Hypoxie bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen. Die Inkubationszeit betrug 48h bei 125 000 Zellen Ausgangszellzahl/ml in der 24-Well-Platte. Gezeigt ist der prozentuale Anteil Annexin- und 7AAD-negativer Zellen in der Durchflusszytometrie nach 48h DP-, oder Kontrollbehandlung mit RPMI oder EtOH. n=3.

Neben Wachstum, Laktatproduktion, Zellviabilität und Apoptoseinduktion wurden die Zellen unter chemischer Hypoxie auch mikroskopisch beurteilt. Mittels eines digitalen Mikroskops wurden die verschiedenen Ansätze zwanzigfach vergrößert und fotografiert. Die Behandlung mit chemischer Hypoxie führte bei allen Klonen zu einer Veränderung der Morphologie im Sinne einer Verflachung, Vergrößerung und eines Formverlustes der Zellen. Zudem führte die Behandlung zu einer Zunahme von auf der Oberfläche schwimmenden apoptotischen Zellen und zu einer verminderten Zelldichte am Wellboden (Abb. 4.19 g).

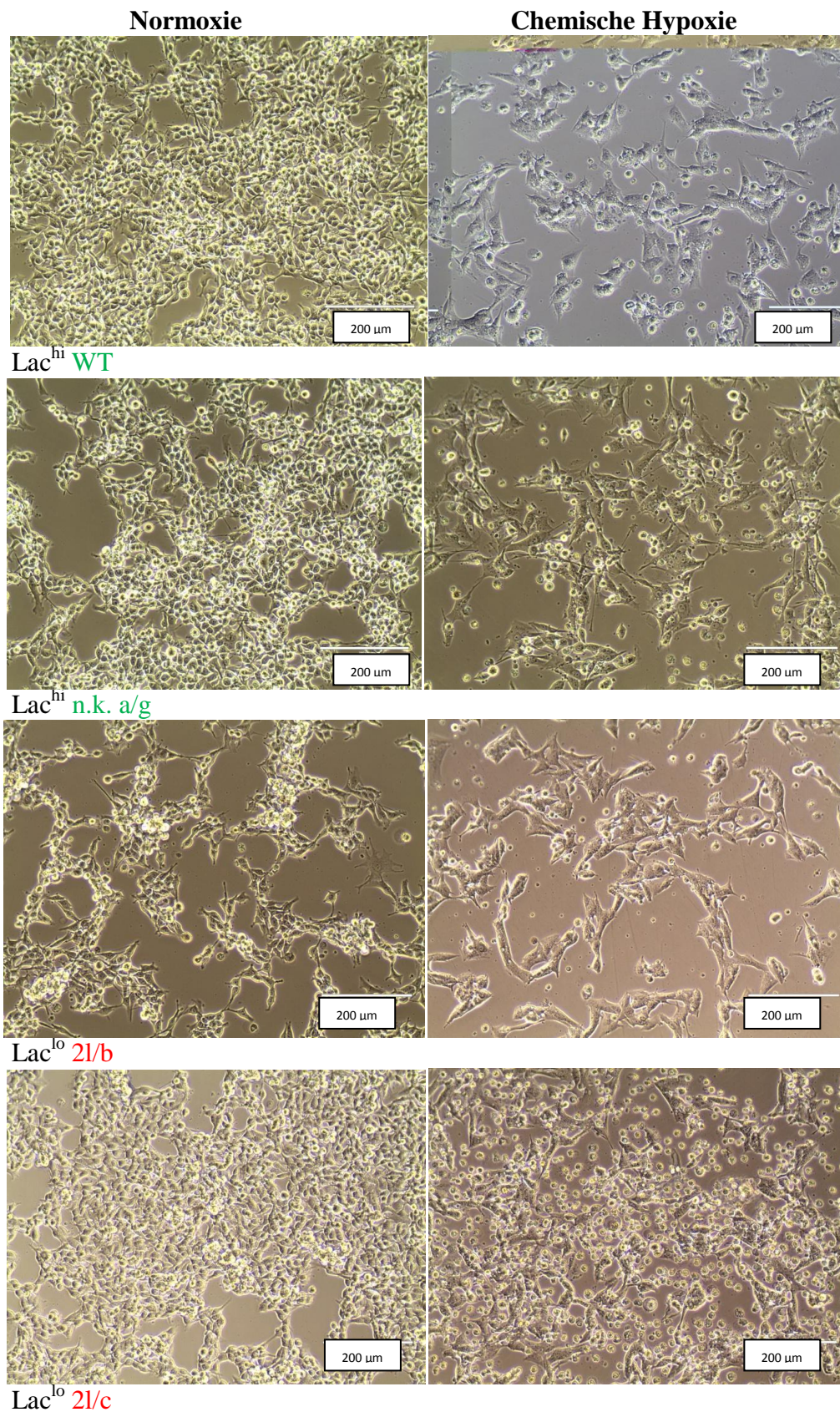


Abb. 4.19 g Beeinflussung der Zellmorphologie durch 48h Chemische Hypoxie. Die Inkubationszeit betrug 48h bei 125 000 Zellen Ausgangszellzahl/ml in der 24-Well-Platte. Bei jedem Versuch wurden die Zellen in zehnfach-, zwanzigfach- und vierzigfach-Vergrößerung fotografiert. Gezeigt sind repräsentativ zwanzigfache Vergrößerungen, abfotografiert mit einem digitalen Mikroskop vom Wellboden der 24-Well-Platten. n = 3.

4.3.2 Einfluss von IFN- γ

IFN- γ ist eines der wichtigsten Zytokine in der Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen gegen Infektionskrankheiten und Tumore [66]. Seine unterstützende Funktion konnte neben vielen anderen Beispielen in einem *in vivo* Modell mit einer Brustkrebs-Zelllinie unter Beweis gestellt werden, hier trug IFN- γ zur Stimulation der Immunantwort der T-Lymphozyten bei [74]. Bei intrazellulären Infektionen bakterieller oder viraler Ursache aber auch bei Tumoren kommt es zu einer Aktivierung von CD4⁺ Th1-Zellen. Diese aktivieren wiederum Makrophagen, u.a. über die IFN- γ Sekretion und fördern so die effektive Immunantwort. [67,75]. IFN- γ kann auch direkten Einfluss auf Tumorzellen nehmen. In dieser Arbeit wurde der Effekt von IFN- γ auf die Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone untersucht.

4.3.2.1 Proliferation

Die hier charakterisierten murinen B16-Klone wurden durch murines IFN- γ stark beeinflusst: Das Zytokin bewirkte eine signifikante Reduktion der Proliferation. Im Vergleich der Reaktion auf IFN- γ bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen reagierten beide Gruppen mit einer signifikanten Reduktion des ³H-Thymidin-Uptakes um ca. 70-75% (Abb. 4.20).

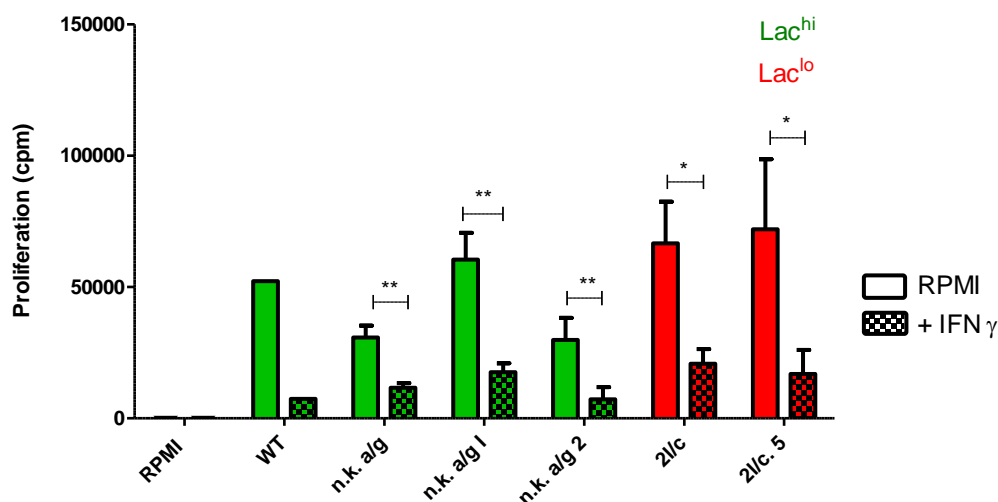


Abb. 4.20 Signifikante Reduktion der Proliferation von Lac^{hi} - und Lac^{lo}-Klonen unter 20ng/ml IFN- γ . Die Proliferation wurde mittels ³H-Thymidinassay mit 125 000 Zellen/ml in der 96-Well-Platte nach einer Inkubationszeit von 24h gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferationsmessungen mit dem ³H-Thymidin Proliferationsassay. n=3.

4.3.2.2 Laktat und Glukose

Durch die Hemmung der Proliferation könnte auch die Laktatproduktion indirekt beeinflusst werden. Um dies zu zeigen, wurden Laktat- und Glukosekonzentration in Zellkulturüberständen nach 24h in einer 24-Well-Platte mit 200 000 Zellen/ml gemessen.

Es konnte eine Reduktion der Laktatproduktion unter IFN- γ bei jedem Klon in jedem der drei

durchgeführten Versuche gezeigt werden. In der Zusammenfassung der drei durchgeführten Versuche war dieser Unterschied bei den Klonen n.k. a/g und 2 l/c signifikant (Abb. 4.21 A). Die Glukosekonzentration im Überstand verhielt sich in jedem Versuch gegenläufig zur Laktatkonzentration der entsprechenden Probe (Abb. 4.21 B).. Somit haben die Zellen unter dem Einfluss von IFN- γ weniger Glukose verbraucht, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen deutlich vermindert proliferierten

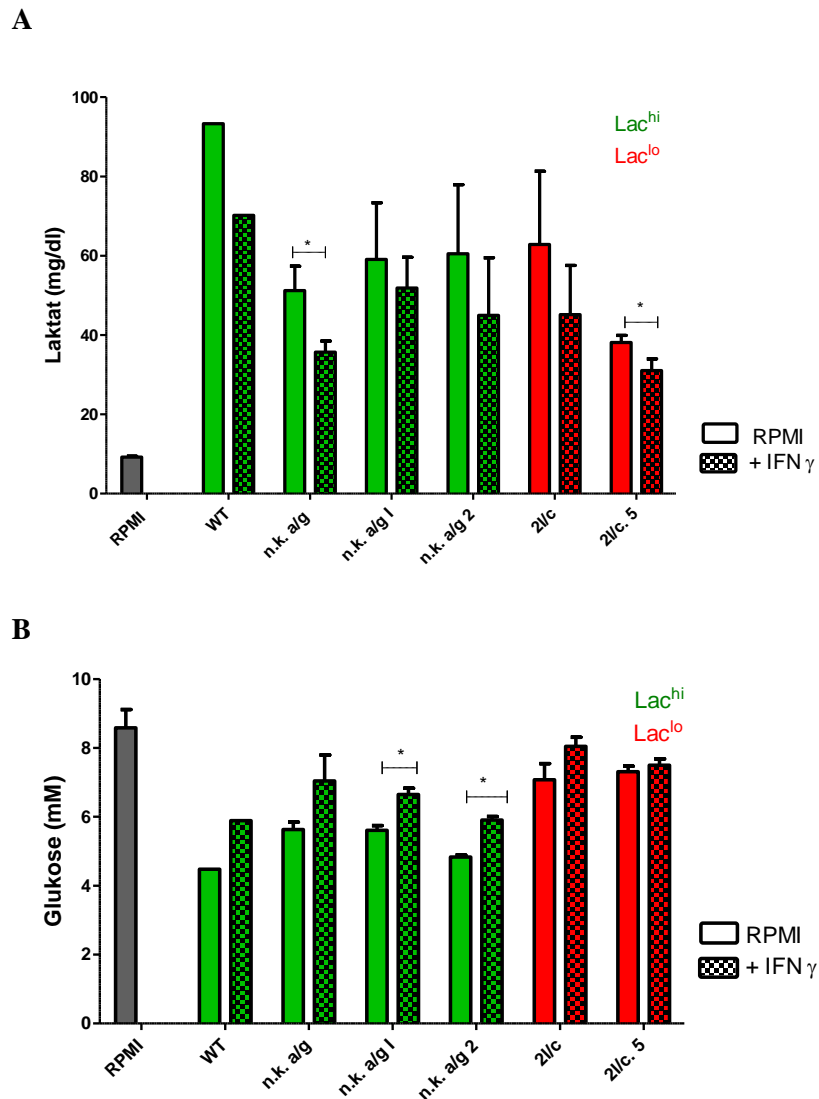


Abb. 4.21 A und B Herabgesetzte Laktatproduktion (A) und geringerer Glukoseverbrauch (B) durch IFN- γ . Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Laktat- und Glukosekonzentration im Überstand der Zellkultur bei 200 000 Zellen/ml und 24h Inkubationszeit in der 24-Well-Platte. (n \geq 3, außer WT: n=1 und n.k. a/g 2: n=2)

4.3.2.3 Sauerstoffverbrauch

Die Lac^{lo}-Klone verbrauchten wie bereits beschrieben mehr Sauerstoff als die Lac^{hi}-Klone, obwohl dieser Unterschied statistisch nicht bei jedem Vergleichspaar aus Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen signifikant war.

Im Folgenden geht es um den Einfluss von 20 ng/ml IFN- γ auf den Sauerstoffverbrauch: Der Sauerstoffverbrauch der Klone wurde durch den Zusatz von 20 ng/ml IFN- γ nicht signifikant verändert. Zusammenfassend wurde demnach die Proliferation der Zellen laut Thymidinassay um 70-75% reduziert, ebenso wurde die Laktatproduktion reduziert, der Sauerstoffverbrauch blieb dennoch derselbe. Es wurde demnach auch in Zellen, die im Thymidinassay ca. 70% weniger Proliferation zeigten, derselbe Sauerstoffverbrauch verzeichnet (Abb. 4.22).

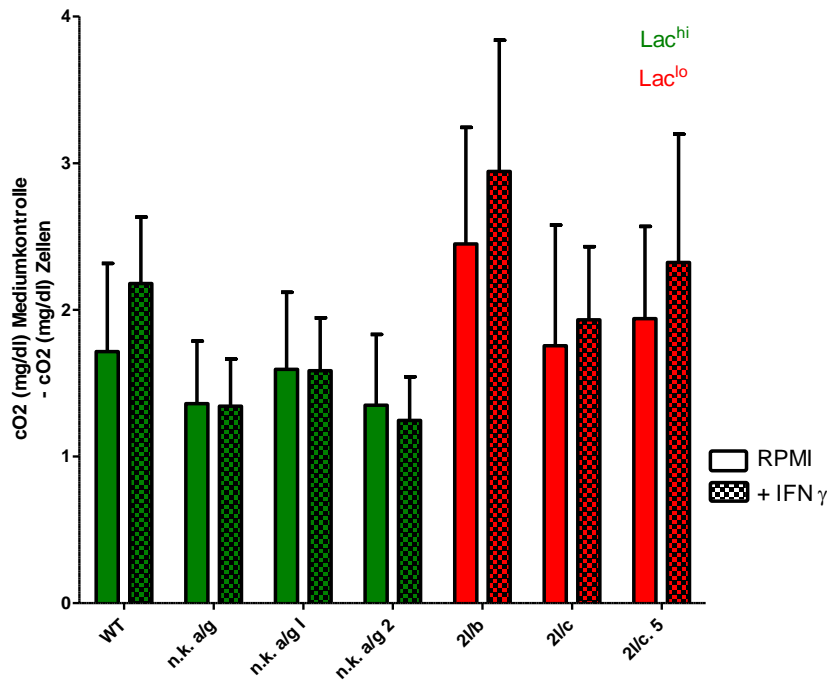


Abb. 4.22 Gleichbleibender Sauerstoffverbrauch nach Exposition mit IFN- γ . Mittels der PreSens-Technologie wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium bei 200 000 Zellen/ml in der 24-Well-Platte und 12h Inkubationszeit bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des O₂-Verbrauchs der B16-Klone. Die Werte für den Verbrauch wurden ermittelt als Differenzen in der Sauerstoffkonzentration zwischen Wells mit Mediumkontrolle und Wells mit Zellen. Gezeigt wird das Ergebnis von drei Versuchstagen, an denen jeweils 2 Wells mit und 2 Wells ohne IFN- γ angesetzt wurden. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der somit insgesamt sechs angesetzten Wells gleicher Behandlung voneinander. (n = 6, außer WT: n = 3).

4.3.2.4 Oberflächenexpression der Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone nach Gabe von IFN- γ

IFN- γ wird u.a. von CD8⁺ T-Zellen und TH1-Zellen, einer Subpopulation der T-Helferzellen sezerniert und führt u.a. zur Hochregulation von MHC-Molekülen. Diese sind wichtig für die Induktion einer Immunantwort gegen Tumore [66]. Somit war die Reaktion der Klone auf IFN- γ von Interesse, insbesondere jedoch, ob Unterschiede in der Reaktion zwischen Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen bestehen. Da zahlreiche Tumore auf ihrer Oberfläche MHC-II, im murinen System Iab, exprimieren und es zusätzlich durch IFN- γ hochregulieren, war es wichtig zu wissen, wie Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone auf IFN- γ reagieren. MHC-II beeinflusst maßgeblich die

T-Zell-vermittelte Immunantwort. MHC-II wird normalerweise nur auf antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Es dient der Kommunikation mit T-Helferzellen, sobald darauf ein körperfremdes Antigen präsentiert wird. So wird die weitere Immunantwort in Gang gesetzt [66]. Dass jedoch auch Tumore MHC-II bzw. Iab exprimieren wurde bereits erörtert. Für *in vivo* Versuche zur Immuninfiltration der entsprechenden Tumore ist somit der Einfluss von IFN- γ auf die MHC-Expression *in vitro* wichtig, um *in vivo* Ergebnisse richtig interpretieren zu können. Iab ist auf allen Klonen bei einem Teil der Zellen konstitutiv exprimiert. Jedoch wird unter dem Einfluss des immunmodulatorischen Zytokins IFN- γ die Expression dieses Oberflächenmoleküles hochreguliert. Unter dem Einfluss von IFN- γ exprimierten über 90 % der Zellen Iab (Abb. 4.23). Die Expression von Iab variierte je nach Versuchsdatum um ca 10-20%. Dies traf sowohl für den Ansatz mit als auch für den Ansatz ohne IFN- γ zu.

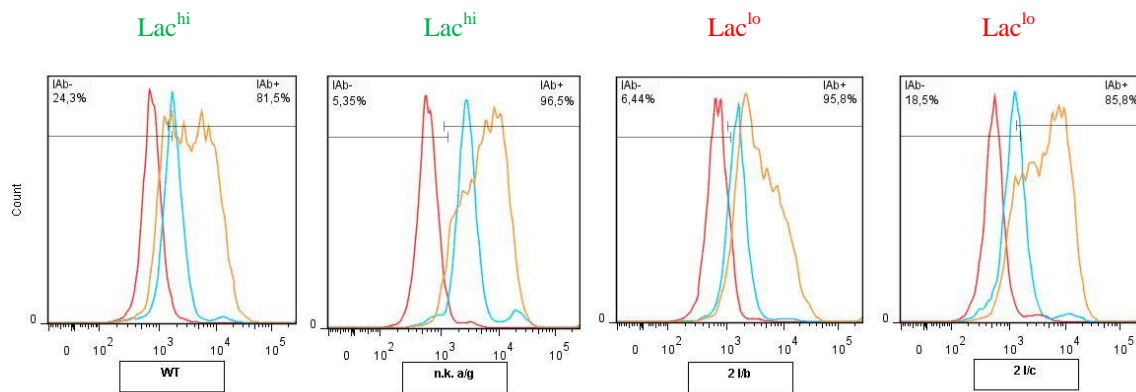


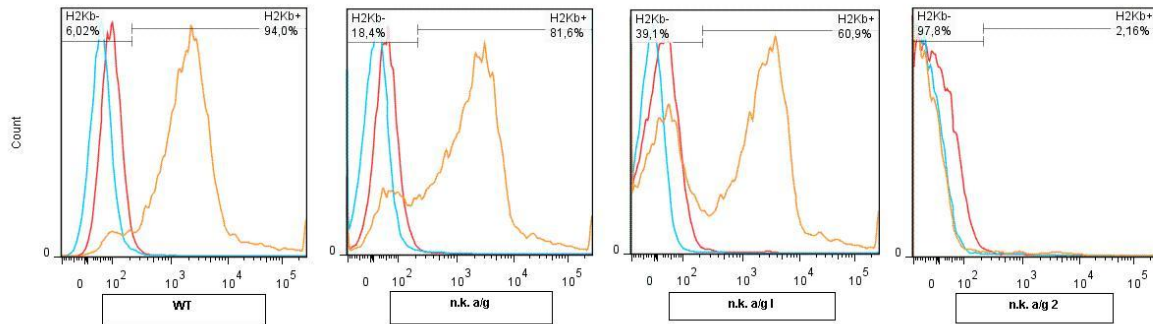
Abb 4.23 Nahezu vollständige Hochregulation der Iab-Expression unter 20 ng/ml IFN- γ . Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist bei Färbung und prozentualer Darstellung ein repräsentatives dreier durchgeführter Experimente. Rot = Isotyp, Blau = gefärbte Zellen ohne IFN- γ , Orange = gefärbte Zellen mit IFN- γ .

Im murinen Klassifikationssystem entspricht H2Kb dem menschlichen Major Histocompatibility Complex I, kurz MHC-I. Dieser wird auf nahezu allen körpereigenen Zellen an der Zelloberfläche präsentiert. Eine Veränderung des MHC-I tritt bei Infektionen oder bei Mutationen des Erbgutes auf. So können Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden, deren Mutation oder Infektion eine potentielle Gefahr für den Organismus darstellt. [66]. Dass eine nicht vorhandene Expression des MHC-I einen „Immune Escape“ Mechanismus bei Tumoren darstellen kann, wurde bereits erörtert.

H2Kb war auf den charakterisierten Klonen nicht exprimiert, jedoch wurde es unter dem Einfluss von IFN- γ hochreguliert. Dies erfolgte nicht bei allen Klonen, zusätzlich war die Hochregulation nicht bei jedem Klon bei der vollständigen Zellpopulation messbar. n.k. a/g 2

und 2l/b zeigten keine Hochregulation; bei den übrigen Klonen zeigte sich eine Hochregulation von H2Kb von 0 auf 60-90% (Abb. 4.24).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

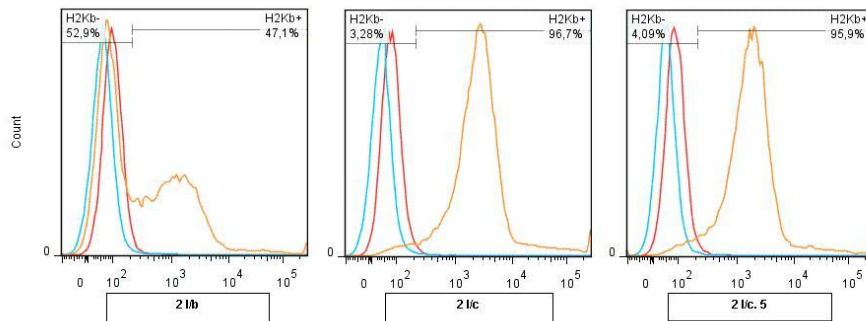
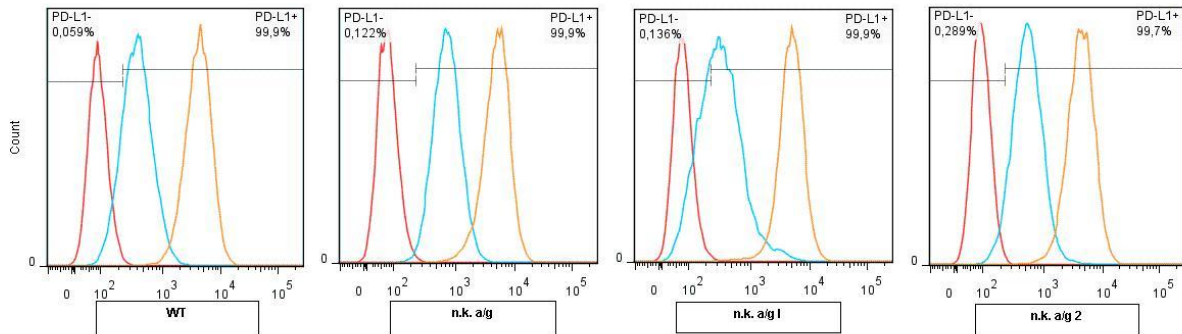


Abb 4.24 Gesteigerte H2Kb-Expression unter IFN- γ Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives dreier durchgeführter Experimente.

Rot = Isotyp, Blau = gefärbte Zellen ohne IFN- γ , Orange = gefärbte Zellen mit IFN- γ .

Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) ist ein Oberflächenmolekül, welches im Lymphknoten aktivierte CD8^+ T-Zellen in ihrer Proliferation hemmt [70]. Es sendet somit ein immunsuppressives Signal aus und stört die Immunantwort gegen Tumorzellen. Es war auf den Tumorzellen konstitutiv exprimiert und wurde durch IFN- γ hochreguliert. Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klone regulierten es in gleicher Intensität hoch (Abb 4.25).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

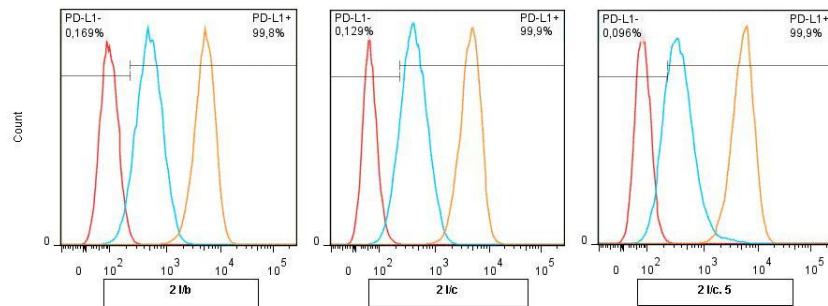
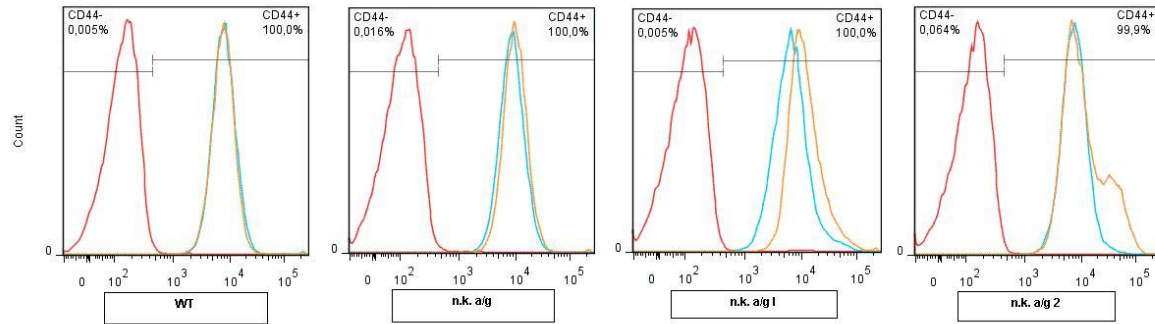


Abb 4.25 Hochregulation von PD-L1 durch IFN-γ. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives dreier durchgeführter Experimente. Rot=Isotyp, Blau= gefärbte Zellen ohne IFN-γ, Orange=gefärbte Zellen mit IFN-γ

CD44 spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Zell Interaktion, Migration und Zelladhäsion. Es war auf den B16-Klonen konstitutiv exprimiert und wurde durch IFN-γ nicht weiter hochreguliert (Abb. 4.26).

Lac^{hi}



Lac^{lo}

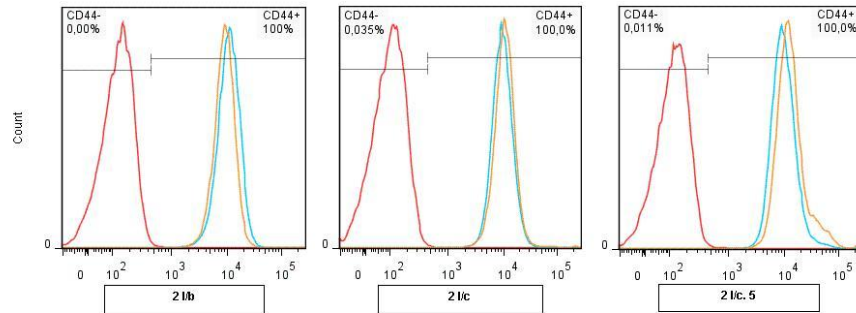


Abb 4.26 Kein Einfluss von IFN-γ auf die Oberflächenexpression von CD44. Die Zellen wurden 24 h in einer Konzentration von 200 000 Zellen/Well in der 24-Well-Platte inkubiert, anschließend gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives dreier durchgeführter Experimente. Rot=Isotyp, Blau= gefärbte Zellen ohne IFN-γ, Orange=gefärbte Zellen mit IFN-γ

5. Diskussion

5.1 LDHA- und LDHB-Expression von Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen

Der veränderte Tumorstoffwechsel, insbesondere die verstärkte Glykolyse von Tumorzellen, ist ein bekanntes Phänomen. In den letzten Jahren wurde zunehmend diskutiert, ob die verstärkte Glykolyse von Tumorzellen ein mögliches Ziel für die Tumorthherapie darstellt. Hierbei wird meist untersucht, ob die Herunterregulation oder Blockade von Transportern oder Enzymen, die im Glukosestoffwechsel wichtig sind, das Tumorwachstum direkt hemmen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, Zelllinien *in vitro* zu charakterisieren, bei denen die LDHA durch shRNA herunterreguliert wurde. Zunächst wurde der erfolgreiche Knockdown der LDHA mittels RT-PCR und Western Blot überprüft. Bei beiden Methoden konnte auch eine stärkere Expression der LDHB in den Lac^{lo}-Klonen nachgewiesen werden. LDHB katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Laktat, also die der LDHA entgegengesetzte Reaktion. Bei vielen der zitierten Publikationen, welche einen Knockdown der LDHA untersuchten, war die LDHB nicht analysiert worden [16,26,76,77]. In den Arbeiten von Riwzan *et al.* sowie Xie *et al.* hatte der Knockdown der LDHA im Gegensatz zu unserem Modell keinen Einfluss auf die Expression von LDHB [25,78]. Eine erhöhte Expression der LDHB könnte eine erhöhte Produktion von Pyruvat zufolge haben. Hierfür müsste man in unserem Modell die Pyruvatproduktion der Zellen bestimmen, um damit Rückschlüsse auf die Aktivität und Konzentration der LDHB ziehen zu können. Eine andere interessante Analyse wäre, die Konzentration der Isoformen der LDH zu messen. LDH ist ein Tetramer aus zwei verschiedenen Proteinuntereinheiten LDHA und LDHB. Somit können fünf Isoenzyme gebildet werden: LDH1 besteht aus vier LDHB, LDH2 aus drei LDHB und einer LDHA, LDH3 aus je zwei LDHA und LDHB, LDH4 aus drei LDHA und einer LDHB, LDH5 aus vier LDHA. Die Untersuchung der Isoformen LDH1-5 ist in der Humanmedizin z.B. aus der Herzinfarktdiagnostik bekannt. Diese Methode ist inzwischen zugunsten der Diagnostik mit dem herzspezifischen Troponin verlassen worden. Für das Mausmodell müsste eine passende Methode etabliert werden, um Rückschlüsse auf die Konzentrationen von LDH1-5 in der Zelle zu erhalten.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass es für die *in vivo* Versuche letztendlich von Bedeutung ist, welche Unterschiede in den Zellkulturüberständen bezüglich des Laktats gemessen werden. Hier unterscheiden sich Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone signifikant voneinander. In den bisherigen *in vivo* Versuchen konnte verifiziert werden, dass sich auch die Laktatkonzentrationen im Tumor

bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Tumoren signifikant voneinander unterscheiden [79]. In der Arbeit von Rizwan *et al.* erfolgte ebenfalls ein Knockdown der LDHA mittels sh-RNA bei einer Zelllinie von murinen Brustkrebszellen. Hierbei resultierte der Knockdown in einer verminderten Konzentration sowohl von LDHA als auch von Laktat und einem geringeren Glukoseverbrauch *in vitro*. *In vivo* wurden geringere intratumorale Laktatkonzentrationen gemessen, zudem resultierte ein langsames Wachstum des Primärtumors und eine verzögerte Metastasierung [25].

5.2. Einfluss der LDHA-Expression auf das Wachstum und den Metabolismus der Tumorzellen

5.2.1 Proliferation und Sauerstoffverbrauch

Für die *in vivo* Versuche zur Immuninfiltration von Tumoren ist es wichtig, Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone zu selektionieren, die *in vitro* gleiche Wachstumsraten aufweisen. Unterschiede beim Wachstum der Klone in der Maus können demnach nicht auf unterschiedliches Proliferationsverhalten *in vitro* zurückgeführt werden. Die bisherigen Analysen zeigen, dass die Lac^{lo}-Klone *in vitro* zum Teil mehr Wachstum zeigen. Der Klon n.k. a/g zeigte in sämtlichen Analysen ein vergleichsweise langsames Wachstum, sodass von ihm beispielsweise in der Zellkultur immer ca. 1 Mio mehr Zellen ausgesät werden mussten, um dieselbe Anzahl an Zellen zu erhalten wie bei den anderen Klonen. Auch seine Laktatproduktion lag immer unter der der anderen Lac^{hi}-Klone. Er war demnach für *in vivo* Experimente weniger geeignet. Zu lange Kulturdauern, zu lange Lagerung bei -80°C statt im Stickstofftank, schädliche Einflüsse des DMSO-Einfriermediums oder des Trypsin-EDTA können hierbei nicht ausgeschlossen werden.

Die teilweise höheren Proliferationsraten *in vitro* der Lac^{lo}-Klone stellen jedoch insofern kein Problem dar, da *in vivo* gerade diese Klone signifikant vermindert wachsen, dies aber nur in Mäusen mit intaktem Immunsystem [79].

Zudem ist der Proliferationsmarker Ki-67 auf allen Zellen exprimiert. Dieser sagt zwar nichts über die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen aus, eine Positivität aller Zellen schließt aber zumindest aus, dass die Zellen in einen sich nicht teilenden Zustand übergegangen sind, da die Ki-67-Färbung keine Zellen anfärbt, welche sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden. In der Arbeit von Fantin *et al.* wurden ebenfalls Tumorzellen einem LDHA-Knockdown unterzogen. Resultat war eine Steigerung der Zellatmung in den Mitochondrien, eine Reduktion der Proliferation unter hypoxischen Bedingungen sowie ein verzögertes Tumorstadium *in vivo* [77]. Rizwan *et al.* konnten zeigen, dass ein Knockdown der LDHA

in vitro assoziiert war mit einer reduzierten Laktatsekretion, geringerer Proliferation und Invasion, gesteigertem Sauerstoffverbrauch und gesteigerter Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies. Die entsprechenden *in vivo* Daten zeigten ein langsames Wachstum von Primärtumoren und eine verzögerte Metastasierung [25]. Xie *et al.* analysierten eine murine Zelllinie eines Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms und zeigten, dass seine geringere Expression der LDHA mit einem geringeren Tumorstadium assoziiert war, zudem konnte *in vitro* eine Steigerung der mitochondrialen Aktivität gezeigt werden [78]. In einer Arbeit von Le *et al.* wurde an einer humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie ein siRNA-Knockdown der LDHA oder eine Inhibition der LDHA mittels FX11 durchgeführt [16]. Die Autoren fanden einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, erhöhte Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einen erhöhten Anteil spätapoptotischer Zellen sowie eine reduzierte Proliferation *in vitro*. Die Induktion von Apoptose wurde von den Autoren als Folge der ROS gedeutet. Die erhöhte Produktion von ROS sehen die Autoren als Folge einer erhöhten mitochondrialen Aktivität, zu welcher die Zellen mit fehlender Möglichkeit der aeroben Glykolyse gezwungen werden. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam auch eine jüngere Arbeit aus dem Jahre 2013 von Arseneault *et al.* Hierbei resultierte ein Knockdown der LDHA bei einer immortalisierten Adenokarzinomzelllinie in reduzierter Proliferation und Migration der Zellen und in einer erhöhten Konzentration von ROS in den Mitochondrien [76]. Die eben genannten Arbeiten sowie eine Arbeit von Yao *et al.* [80] beschrieben eine reduzierte Proliferation der Zellen, welche einem LDHA-Knockdown unterzogen waren. In letzterer Arbeit wurde neben einer reduzierten Proliferation *in vitro* auch ein vermindertes Wachstum *in vivo* gemessen: Im Gegensatz hierzu konnten wir bei unseren Klonen zeigen, dass *in vitro* gleich proliferierende Zellen *in vivo* zu unterschiedlichem Tumorstadium führten.

Die Ergebnisse oben genannter Publikationen decken sich weitgehend mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe. Als entscheidender Unterschied ist hervorzuheben, dass der Knockdown der LDHA nicht *in vitro* zu einer reduzierten Proliferation führte, sondern dass erst *in vivo* bei immunkompetenten Mäusen eine Reduktion des Tumorstadiums auftrat, was die These stützt, dass die Laktatsekretion Einfluss nimmt auf die Immuninfiltration und damit auf das Wachstum von Tumoren [79]. Ergänzend hätte in unserem Modell auch der Nachweis von ROS bei Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klonen im Vergleich stattfinden können. Allerdings passt der Umstand, dass in unserem Modell die Unterschiede bezüglich des Sauerstoffverbrauchs bei Lac^{hi} und Lac^{lo} im Vergleich nicht so ausgeprägt waren, zu der Tatsache, dass die Zellen in unserem Modell keine erhöhte Apoptose zeigten. Zudem konnte in unserem Modell ein erhöhter Gehalt an Mitochondrien in den Zellen nachgewiesen werden [79].

5.2.2 Glukoseverbrauch

Der Glukosetransporter Glut-1 ist in entscheidendem Maße für die Versorgung von Tumorzellen mit Glukose verantwortlich. Obwohl die Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone einen unterschiedlichen Glukoseverbrauch aufweisen, war ein Unterschied in der Expression von Glut-1 weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Dies ist insofern von Bedeutung, als somit der Unterschied in der Laktatproduktion nicht auf eine unterschiedliche Ausstattung mit Glut-1 zurückzuführen ist.

Der geringere Glukoseverbrauch der Lac^{lo}-Klone macht deutlich, dass ein erheblicher Teil des Laktats aus Glukose gewonnen wird und dass nicht primär Aminosäuren wie das im Medium ausreichend vorhandene Glutamin die Hauptquelle zur Laktatproduktion darstellen. Von vielen Tumoren ist bekannt, dass sie auch verstärkt Glutaminolyse betreiben und auf diese Weise ihre Laktatproduktion aufrecht erhalten [4]. Ergänzend zu den bisherigen Analysen könnte Glutamin in den Überständen analysiert werden, um die Behauptung zu stützen, das produzierte Laktat entstamme zum größten Teil der Glukoseverstoffwechselung.

5.3 Einfluss der veränderten LDHA Expression auf Oberflächenexpression

Laktat wird mit einer Änderung des Migrationsverhaltens von Tumor- und Immunzellen in Zusammenhang gebracht [11,76,81], daher sollte dieser Aspekt bei der Charakterisierung der Klone berücksichtigt werden. Beispielsweise wurde eine dosisabhängige Steigerung der Migration von Tumorzellen und eine Hemmung der Migration von Monozyten durch exogen zugeführtes Laktat in Boyden Chamber Versuchen beschrieben [60]. Wie allerdings die Klone auf das von ihnen selbst produzierte Laktat bezüglich ihrer Migration reagieren, bleibt bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten offen. Ein Versuchsaufbau mit einer Boyden Chamber wäre hier zur weitergehenden *in vitro* Charakterisierung denkbar. Laktat steigert bei Fibroblasten *in vitro* die Hyaluronsäureproduktion und erhöhte die Expression von CD44 [11]. Hyaluronsäure ist im umgebenden Tumorstroma in erhöhter Konzentration vorhanden [82]. Bezüglich der Fähigkeit zur Zell-Zellinteraktion und Adhäsion wurde die Expression des Oberflächenmoleküls und Hyaluronsäurerezeptors CD44 untersucht. CD44 war sowohl auf den Lac^{hi} als auch auf den Lac^{lo} Klonen exprimiert und wurde durch IFN- γ nicht beeinflusst. Ebenso konnte bezüglich der Expression von PD-L1, welches immunsuppressiv und Apoptose induzierend auf T-Zellen wirkt [70], kein Unterschied zwischen Lac^{hi} und Lac^{lo}-Klonen gefunden werden. Es war auf allen Zellen exprimiert und wurde durch IFN- γ hochreguliert.

MHC-I, im murinen System H2Kb, ist bei der Erkennung von Tumoren durch zytotoxische T-Lymphozyten essentiell [68]. Der Verlust von MHC-I ist ein bei vielen Tumoren auftretendes Phänomen und kann einen „Immune Escape“ der Tumorzellen bedeuten [69]. In unserem Modell war MHC-I auf allen Klonen nicht exprimiert. Unter IFN- γ wurde MHC-I bei allen Klonen mit Ausnahme der Klone 2 l/b und n.k. a/g 2 hochreguliert. Eine gleichartige Expression von MHC-I deutet darauf hin, dass eine unterschiedliche Immuninfiltration *in vivo* nicht durch unterschiedliche MHC-I-Expression bedingt ist. Zudem unterstreicht dieses Ergebnis, dass bei Tumoren mit MHC-I-Verlust das Zytokin IFN- γ , welches die MHC-I Expression induzieren kann, eine Schlüsselfunktion bei der Initiation der Immunantwort übernehmen kann.

Eine weitere für die Interpretation der *in vivo*-Versuche wichtige Analyse ist die *in vitro*-Charakterisierung von Iab entsprechend dem menschlichen MHC-II. Dieses ist auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, dient somit der Präsentation von körperfremden Antigenen und letztlich der Aktivierung der zellulären Immunantwort durch T-Zellen [66]. Das Vorhandensein von MHC-II auf im Tumor vorhandenen Zellen hat also eine entscheidende Bedeutung für die T-Zell-Antwort auf ein Tumorgeschehen. Viele murine Tumorzelllinien verfügen nicht über eine durch IFN- γ induzierbare MHC-II-Expression [67]. Umso interessanter ist, dass in unserem Modell MHC-II bereits konstitutiv sehr schwach exprimiert war und zudem durch IFN- γ auf über 90% MHC-II positive Zellen hochreguliert werden konnte.

5.4 Einfluss von Hypoxie auf Lac^{hi}- und Lac^{lo}-Klone

Hypoxie als verbreitetes Merkmal von Tumoren sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Im Tumormilieu kann durch schnelles Tumorstadium eine schlechte Gefäßversorgung zur Hypoxie, also zur unzureichenden Sauerstoffversorgung führen. Daher wurde untersucht, ob Hypoxie die hier charakterisierten Klone bezüglich Proliferation und Laktat verändert.

Die analysierten Klone änderten bei einer Reduktion des Umgebungssauerstoffs auf 1% weder Proliferation noch Laktatproduktion. Zur Interpretation müssen folgende Gesichtspunkte erwähnt werden: grob zusammengefasst ist im kapillären Stromgebiet der Sauerstoffpartialdruck etwa halb so groß wie in der umgebenden Luft auf Meereshöhe. Somit kann es sein, dass Zellen auf eine Reduktion auf ein Zehntel des kapillären Sauerstoffstoffpartialdruckes noch nicht reagieren, da immer noch genug Sauerstoff zu den Zellen gelangt. Bei dem beschreibenden Versuchsaufbau muss außerdem in Frage gestellt

werden, ob es sich definitionsgemäß um eine Hypoxie handeln kann, wenn die Zellen zur Proliferationsmessung nach Inkubation für 24 Stunden im Hypoxieschrank und dem anschließenden Labeln für die anschließenden fünf Stunden bei Normoxie gelagert werden.

In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob der Knockdown der LDHA eine höhere Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht. Wie bereits erörtert, führte in humanen Pankreaszelllinien ein siRNA-Knockdown *in vitro* zu oxidativem Stress und Nekrose [16]. Auch in einer besonders zur Metastasierung neigenden Tumorzelllinie eines hepatozellulären Karzinoms wurde durch den Knockdown der LDHA eine vermehrte Apoptose der Tumorzellen durch reaktive Sauerstoffspezies beobachtet [83]. Somit weicht unser Ansatz von dem der genannten Arbeiten ab: Ein LDHA-Knockdown führt nicht zum Proliferationsstop. Die hier vorliegende Arbeit zielt vielmehr auf andere Effekte als die Induktion von Zelltod durch den Knockdown der LDHA ab. Ergänzend hätte eine Analyse der ROS bei den Klonen stattfinden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ergänzend der Einfluss chemischer Hypoxie auf die Klone untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion der Zellviabilität und deutliche Veränderung der Zellmorphologie bei einer gleichzeitigen Steigerung der Laktatproduktion durch die übriggebliebenen noch viablen Zellen. Eine Stabilisierung von HIF1 α würde erwartungsgemäß zur Hochregulation von glycolytischen Enzymen führen [53]. Die chemische Hypoxie mit DFX, einem Stabilisator von HIF, scheint diesen Effekt auf die Zellen zu haben, jedoch auch zur vermehrten Apoptose zu führen. Unter dem Einfluss chemischer Hypoxie durch DP, einem Chelator zweiwertigen Eisens, zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Zellviabilität mit gesteigerter Laktatproduktion bezogen auf die Anzahl der noch viablen Zellen. Eine mögliche Interpretation ist, dass chemische Hypoxie, d.h. die totale Blockade bestimmter biochemischer Prozesse, die Tumorzellen in vielfältiger Weise unabhängig vom LDHA-Status verändert und mit „normaler“ Hypoxie in keiner Weise vergleichbar zu sein scheint.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Von unserer Arbeitsgruppe wurden stabile murine Melanomzelllinien mit einem shRNA-Knockdown der LDHA etabliert. Als Kontrollgruppe wurden mit scrambled RNA behandelte Melanomzelllinien etabliert. Die Zellen mit Knockdown der LDHA (Lac^{lo}) zeigten eine herabgesetzte Laktatproduktion. In Vorarbeiten wurden von beiden Zelllinien Subklone generiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von den Klonen und Subklonen dieser Zelllinien *in vitro*. Diese Charakterisierung brachte den Nachweis, dass sich Lac^{hi} -Klone von Lac^{lo} -Klonen bezüglich Proliferationsverhalten, Oberflächenexpression immunmodulatorischer Antigene, der Genexpression glykolytischer Enzyme und anderer Stoffwechselgene (z.B. IDO1/2, Arginase_1 und 2) nicht unterscheiden. Die Zellen unterscheiden sich jedoch insofern voneinander, als Lac^{lo} -Klone mehr Sauerstoff verbrauchen. Unter chemischer Hypoxie reagierten Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klone mit einer gesteigerten Laktatproduktion und vermehrter Apoptose der Zellen, jedoch reagierten Lac^{hi} - und Lac^{lo} -Klone ähnlich.

Es wurde also bestätigt, dass es sich bei den Klonen um ein geeignetes Modell handelt, um Tumorzellen mit hoher und geringer Laktatproduktion *in vivo* zu vergleichen, da sie sich weitgehend durch nichts als ihre Laktatproduktion und ihren Sauerstoffverbrauch unterscheiden. Somit dient diese Arbeit als Grundlage für *in vivo* Experimente, um den Einfluss von Laktat auf Tumorwachstum und Immunantwort gegen Tumorzellen zu untersuchen.

7. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
5` AMPK	5` Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
ADP	Adenosindiphosphat
ACK	<i>engl.</i> „Ammonium-Chloride-Potassium“
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>engl.</i> „bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
CCD	<i>engl.</i> „charge coupled device“, ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	<i>engl.</i> „cluster of differentiation“
cDNA	<i>engl.</i> „complementary DNA“
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> „desoxyribonukleinacid“
dNTP	desoxyNukleosidTriPhosphat
ECL	<i>engl.</i> „enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl.</i> : „fluorescence-activated-cell-sorting“
FcR	Fc Receptor
G6PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HIF	Hypoxie- induzierter Faktor
HK	Hexokinase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDHB	Laktatdehydrogenase B
Mio	Million
ml	Milliliter
MCP-1	<i>engl.</i> : „monocyte chemotactic protein-1“
mM	MilliMolar
MMLV	<i>engl.</i> : „Moloney Murine Leukemia Virus“
mmol	Millimol
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form

PCR	<i>engl.:</i> „Polymerase chain reaction“
PBS	<i>engl.:</i> „phosphate buffered saline“
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PKM2	Pyruvatkinase M2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>engl.:</i> „Radio-Immunoprecipitation Assay“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>engl.:</i> „Roswell Park Memorial Institut“
RT-PCR	Real-Time-PCR
SDS	<i>engl.:</i> „Sodiumdodecylsulfate“
SIP1	<i>engl.:</i> „ Smad interacting Protein1
THBS	Thrombospondin 1
TBS	<i>engl.:</i> „Tris-Buffered-Saline“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF β	<i>engl.:</i> „Transforming Growth Factor β “
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VHL	Von Hippel Lindau

8. Quellenverzeichnis

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [2] Warburg Otto, On the Origin of Cancer Cells, *Science* 1956 (1956) 309–314.
- [3] I. Saga, S. Shibao, J. Okubo, S. Osuka, Y. Kobayashi, S. Yamada, S. Fujita, K. Urakami, M. Kusuhara, K. Yoshida, H. Saya, O. Sampetean, Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model, *Neuro-oncology* 16 (2014) 1048–1056.
- [4] N.D. Amoêdo, J.P. Valencia, M.F. Rodrigues, A. Galina, F.D. Rumjanek, How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells, *Biosci. Rep.* 33 (2013).
- [5] R.J. Deberardinis, N. Sayed, D. Ditsworth, C.B. Thompson, Brick by brick: metabolism and tumor cell growth, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18 (2008) 54–61.
- [6] K. Singer, E. Gottfried, M. Kreutz, A. Mackensen, Suppression of T-cell responses by tumor metabolites, *Cancer Immunol. Immunother.* 60 (2011) 425–431.
- [7] W. Xu, L.Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, I.G. Charles, The role of nitric oxide in cancer, *Cell Res.* 12 (2002) 311–320.
- [8] V. Bronte, P. Serafini, A. Mazzoni, D.M. Segal, P. Zanovello, L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions, *Trends in immunology* 24 (2003) 302–306.
- [9] A.A. Wu, V. Drake, H.-S. Huang, S. Chiu, L. Zheng, Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells, *Oncoimmunology* 4 (2015) e1016700.
- [10] J. Barar, Y. Omid, Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy, *Bioimpacts* 3 (2013) 149–162.
- [11] F. Hirschhaeuser, Sattler, Ulrike G A, W. Mueller-Klieser, Lactate: a metabolic key player in cancer, *Cancer Res.* 71 (2011) 6921–6925.
- [12] S. Walenta, M. Wetterling, M. Lehrke, G. Schwickert, K. Sundfør, E.K. Rofstad, W. Mueller-Klieser, High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers, *Cancer Res.* 60 (2000) 916–921.
- [13] T.K. Hunt, R. Aslam, Z. Hussain, S. Beckert, Lactate, with oxygen, incites angiogenesis, *Advances in experimental medicine and biology* 614 (2008) 73–80.
- [14] S. Beckert, F. Farrahi, R.S. Aslam, H. Scheuenstuhl, A. Königsrainer, M.Z. Hussain, T.K. Hunt, Lactate stimulates endothelial cell migration, Wound repair and regeneration official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 14 (2006) 321–324.
- [15] Sattler, Ulrike G A, S.S. Meyer, V. Quennet, C. Hoerner, H. Knoerzer, C. Fabian, A. Yaromina, D. Zips, S. Walenta, M. Baumann, W. Mueller-Klieser, Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation, *Radiotherapy and oncology journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 94 (2010) 102–109.
- [16] A. Le, C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, R.E. Royer, Vander Jagt, David L, G.L. Semenza, C.V. Dang, Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 2037–2042.
- [17] G. Kroemer, J. Pouyssegur, Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel, *Cancer Cell* 13 (2008) 472–482.
- [18] L. Zhuang, R.A. Scolyer, R. Murali, S.W. McCarthy, X.D. Zhang, J.F. Thompson, P. Hersey, Lactate dehydrogenase 5 expression in melanoma increases with disease progression and is associated with expression of Bcl-XL and Mcl-1, but not Bcl-2 proteins, *Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (2010) 45–53.

- [19] H. Girgis, O. Masui, N.M. White, A. Scorilas, F. Rotondo, A. Seivwright, M. Gabril, E.R. Filter, A.H. Girgis, G.A. Bjarnason, M.A. Jewett, A. Evans, S. Al-Haddad, K.M. Siu, G.M. Yousef, Lactate dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma, *Mol. Cancer* 13 (2014) 101.
- [20] K. Chen, C. Zhu, M. Cai, D. Fu, B. Cheng, Z. Cai, G. Li, J. Liu, Integrative metabolome and transcriptome profiling reveals discordant glycolysis process between osteosarcoma and normal osteoblastic cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2014).
- [21] T. Ziebart, S. Walenta, M. Kunkel, T.E. Reichert, W. Wagner, W. Mueller-Klieser, Metabolic and proteomic differentials in head and neck squamous cell carcinomas and normal gingival tissue, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137 (2011) 193–199.
- [22] M.I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, M. Panteliadou, S.E. Pouliliou, P.S. Chondrou, S. Mavropoulou, E. Sivridis, Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy, *Br. J. Cancer* 110 (2014) 2217–2223.
- [23] N. Lynam-Lennon, S.G. Maher, A. Maguire, J. Phelan, C. Muldoon, J.V. Reynolds, J. O'Sullivan, Altered mitochondrial function and energy metabolism is associated with a radioresistant phenotype in oesophageal adenocarcinoma, *PLoS ONE* 9 (2014) e100738.
- [24] J. Cui, M. Shi, D. Xie, D. Wei, Z. Jia, S. Zheng, Y. Gao, S. Huang, K. Xie, FOXM1 promotes the warburg effect and pancreatic cancer progression via transactivation of LDHA expression, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 2595–2606.
- [25] A. Rizwan, I. Serganova, R. Khanin, H. Karabeber, X. Ni, S. Thakur, K.L. Zakian, R. Blasberg, J.A. Koutcher, Relationships between LDH-A, lactate, and metastases in 4T1 breast tumors, *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (2013) 5158–5169.
- [26] X. Zhou, R. Chen, W. Xie, Y. Ni, J. Liu, G. Huang, Relationship between 18F-FDG accumulation and lactate dehydrogenase A expression in lung adenocarcinomas, *Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine* 55 (2014) 1766–1771.
- [27] X. Sun, Z. Sun, Z. Zhu, C. Li, J. Zhang, H. Xu, M. Sun, Expression of SIP1 is strongly correlated with LDHA and shows a significantly poor outcome in gastric cancer, *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (2015) 7521–7530.
- [28] C. Pinheiro, V. Penna, F. Morais-Santos, L.F. Abrahão-Machado, G. Ribeiro, E.C. Curcelli, M.V. Olivieri, S. Morini, I. Valença, D. Ribeiro, F.C. Schmitt, R.M. Reis, F. Baltazar, Characterization of monocarboxylate transporters (MCTs) expression in soft tissue sarcomas: distinct prognostic impact of MCT1 sub-cellular localization, *J Transl Med* 12 (2014) 118.
- [29] J.-W. Choi, Y. Kim, J.-H. Lee, Y.-S. Kim, Prognostic Significance of Lactate/Proton Symporters MCT1, MCT4, and Their Chaperone CD147 Expressions in Urothelial Carcinoma of the Bladder, *Urology* 84 (2014) 245.e9-245.e15.
- [30] K. Dettmer, F.C. Vogl, A.P. Ritter, W. Zhu, N. Nürnberger, M. Kreutz, P.J. Oefner, W. Gronwald, E. Gottfried, Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells, *Electrophoresis* 34 (2013) 2836–2847.
- [31] H. Shim, C. Dolde, B.C. Lewis, C.S. Wu, G. Dang, R.A. Jungmann, R. Dalla-Favera, C.V. Dang, c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 6658–6663.
- [32] J. Pouyssegur, F. Dayan, N.M. Mazure, Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression, *Nature* 441 (2006) 437–443.

- [33] C.V. Dang, A. Le, P. Gao, MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities, *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (2009) 6479–6483.
- [34] T.N. Seyfried, Cancer as a mitochondrial metabolic disease, *Frontiers in cell and developmental biology* 3 (2015) 43.
- [35] V.J. Young, J.K. Brown, J. Maybin, Saunders, Philippa T K, W.C. Duncan, A.W. Horne, Transforming growth factor- β induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2014) jc20141026.
- [36] S.J. Bensinger, H.R. Christofk, New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2012) 352–361.
- [37] Z. Li, D. Wang, X. Na, S.R. Schoen, E.M. Messing, G. Wu, The VHL protein recruits a novel KRAB-A domain protein to repress HIF-1 α transcriptional activity, *The EMBO journal* 22 (2003) 1857–1867.
- [38] T. Hitosugi, J. Chen, Post-translational modifications and the Warburg effect, *Oncogene* (2013).
- [39] S. Pavlides, A. Tsigos, I. Vera, N. Flomenberg, P.G. Frank, M.C. Casimiro, C. Wang, P. Fortina, S. Addya, R.G. Pestell, U.E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, M.P. Lisanti, Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the "reverse Warburg effect": a transcriptional informatics analysis with validation, *Cell Cycle* 9 (2010) 2201–2219.
- [40] S. Pavlides, D. Whitaker-Menezes, R. Castello-Cros, N. Flomenberg, A.K. Witkiewicz, P.G. Frank, M.C. Casimiro, C. Wang, P. Fortina, S. Addya, R.G. Pestell, U.E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, M.P. Lisanti, The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (2009) 3984–4001.
- [41] N. Pérttega-Gomes, J.R. Vizcaíno, J. Attig, S. Jurmeister, C. Lopes, F. Baltazar, A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer, *BMC Cancer* 14 (2014) 352.
- [42] E.M. Palsson-McDermott, O'Neill, Luke A J, The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases, *Bioessays* 35 (2013) 965–973.
- [43] M. Jang, S.S. Kim, J. Lee, Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets, *Exp. Mol. Med.* 45 (2013) e45.
- [44] S.E. Elf, J. Chen, Targeting glucose metabolism in patients with cancer, *Cancer* 120 (2014) 774–780.
- [45] V. Ruggieri, F. Agriesti, R. Scrima, I. Laurenzana, D. Perrone, T. Tataranni, C. Mazzocchi, L. Lo Muzio, N. Capitanio, C. Piccoli, Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment, *Oncotarget* (2014).
- [46] S.J. Allison, Knight, J R P, C. Granchi, R. Rani, F. Minutolo, J. Milner, R.M. Phillips, Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways, *Oncogenesis* 3 (2014) e102.
- [47] M.D. Farwell, D.A. Pryma, D.A. Mankoff, PET/CT imaging in cancer: Current applications and future directions, *Cancer* (2014).
- [48] P. Vaupel, A. Mayer, Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome, *Cancer metastasis reviews* 26 (2007) 225–239.
- [49] A.M. Weljie, F.R. Jirik, Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 (2011) 981–989.

- [50] V.A. Chavez-Perez, M. Strasberg-Rieber, M. Rieber, Hypoxia and hypoxia mimetic cooperate to counteract tumor cell resistance to glucose starvation preferentially in tumor cells with mutant p53, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2014) 120–125.
- [51] P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, M.C. Wergin, J. Verrax, Z.N. Rabbani, De Saedeleer, Christophe J, K.M. Kennedy, C. Diepart, B.F. Jordan, M.J. Kelley, B. Gallez, M.L. Wahl, O. Feron, M.W. Dewhirst, Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice, *The Journal of clinical investigation* 118 (2008) 3930–3942.
- [52] K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves, K. Renner, B. Timischl, A. Mackensen, L. Kunz-Schughart, R. Andreesen, S.W. Krause, M. Kreutz, Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells, *Blood* 109 (2007) 3812–3819.
- [53] E. Gottfried, L.A. Kunz-Schughart, S. Ebner, W. Mueller-Klieser, S. Hoves, R. Andreesen, A. Mackensen, M. Kreutz, Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression, *Blood* 107 (2006) 2013–2021.
- [54] S. Radoja, A.B. Frey, Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 6 (2000) 465–479.
- [55] T.L. Whiteside, Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention, *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 3–15.
- [56] Z. Husain, Y. Huang, P. Seth, V.P. Sukhatme, Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells, *J. Immunol.* 191 (2013) 1486–1495.
- [57] Z. Husain, P. Seth, V.P. Sukhatme, Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: Linking metabolism to cancer immunology, *Oncoimmunology* 2 (2013) e26383.
- [58] K. Dietl, K. Renner, K. Dettmer, B. Timischl, K. Eberhart, C. Dorn, C. Hellerbrand, M. Kastenberger, L.A. Kunz-Schughart, P.J. Oefner, R. Andreesen, E. Gottfried, M.P. Kreutz, Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes, *J. Immunol.* 184 (2010) 1200–1209.
- [59] A.N. Mendl, B. Hu, P.U. Prinz, M. Kreutz, E. Gottfried, E. Noessner, Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation, *Int. J. Cancer* 131 (2012) 633–640.
- [60] K. Goetze, S. Walenta, M. Ksiazkiewicz, L.A. Kunz-Schughart, W. Mueller-Klieser, Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release, *Int. J. Oncol.* 39 (2011) 453–463.
- [61] K. Singer, M. Kastenberger, E. Gottfried, C.G. Hammerschmied, M. Büttner, M. Aigner, B. Seliger, B. Walter, H. Schlösser, A. Hartmann, R. Andreesen, A. Mackensen, M. Kreutz, Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 2085–2095.
- [62] C. Haan, I. Behrmann, A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background, *Journal of immunological methods* 318 (2007) 11–19.
- [63] M. Kastenberger, O. Wolfbeis, Analyse und Modulation des Tumormetabolismus in humanen Tumorzelllinien und Tumorgeweben. Regensburg, Universität Regensburg, Diss., 2010, available at <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:355-epub-184134>.
- [64] J. Fan, T. Hitosugi, T.-W. Chung, J. Xie, Q. Ge, T.-L. Gu, R.D. Polakiewicz, G.Z. Chen, T.J. Boggon, S. Lonial, F.R. Khuri, S. Kang, J. Chen, Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is

- important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells, *Molecular and cellular biology* 31 (2011) 4938–4950.
- [65] J.C. Aledo, J.A. Segura, M.A. Medina, F.J. Alonso, Núñez de Castro, I, J. Márquez, Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development, *FEBS Lett.* 341 (1994) 39–42.
 - [66] C.A. Janeway, *Immunologie*, 5th ed., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 2002.
 - [67] J. Thibodeau, M.-C. Bourgeois-Daigneault, R. Lapointe, Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy, *Oncoimmunology* 1 (2012) 908–916.
 - [68] I. Algarra, A. Collado, F. Garrido, Altered MHC class I antigens in tumors, *International journal of clinical & laboratory research* 27 (1997) 95–102.
 - [69] H.T. Khong, N.P. Restifo, Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes, *Nature immunology* 3 (2002) 999–1005.
 - [70] H. Dong, S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, L. Chen, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion, *Nature medicine* 8 (2002) 793–800.
 - [71] Q. Yin, Y.-Y. Zhou, P. Wang, L.I. Ma, P. Li, X.-G. Wang, C.-H. She, W.-L. Li, CD44 promotes the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward glioma, *Oncology letters* 11 (2016) 2353–2358.
 - [72] C. Suci, A. Muresan, R. Cornea, O. Suci, A. Dema, M. Raica, Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast, *Oncology letters* 7 (2014) 107–114.
 - [73] E. Gottfried, M. Kreutz, A. Mackensen, Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression, *Semin. Cancer Biol.* 22 (2012) 335–341.
 - [74] Q. Zhao, L. Tong, N. He, G. Feng, L. Leng, W. Sun, Y. Xu, Y. Wang, R. Xiang, Z. Li, IFN- γ mediates graft-versus-breast cancer effects via enhancing cytotoxic T lymphocyte activity, *Exp Ther Med* 8 (2014) 347–354.
 - [75] Haabeth, Ole Audun Werner, A.A. Tveita, M. Fauskanger, F. Schjesvold, K.B. Lorvik, P.O. Hofgaard, H. Omholt, L.A. Munthe, Z. Dembic, A. Corthay, B. Bogen, How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules?, *Frontiers in immunology* 5 (2014) 174.
 - [76] R. Arseneault, A. Chien, J.T. Newington, T. Rappon, R. Harris, R.C. Cumming, Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration, *Cancer letters* 338 (2013) 255–266.
 - [77] V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder, Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance, *Cancer cell* 9 (2006) 425–434.
 - [78] H. Xie, J.-I. Hanai, J.-G. Ren, L. Kats, K. Burgess, P. Bhargava, S. Signoretti, J. Billiard, K.J. Duffy, A. Grant, X. Wang, P.K. Lorkiewicz, S. Schatzman, M. Bousamra, A.N. Lane, R.M. Higashi, Fan, Teresa W M, P.P. Pandolfi, V.P. Sukhatme, P. Seth, Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells, *Cell metabolism* 19 (2014) 795–809.
 - [79] A. Brand, K. Singer, G.E. Koehl, M. Koltz, G. Schoenhammer, A. Thiel, C. Matos, C. Bruss, S. Klobuch, K. Peter, M. Kastenberger, C. Bogdan, U. Schleicher, A. Mackensen, E. Ullrich, S. Fichtner-Feigl, R. Kesselring, M. Mack, U. Ritter, M. Schmid, C. Blank, K. Dettmer, P.J. Oefner, P. Hoffmann, S. Walenta, E.K. Geissler, J. Pouyssegur, A. Villunger, A. Steven, B. Seliger, S. Schreml, S. Haferkamp, E. Kohl, S. Karrer, M. Berneburg, W. Herr, W. Mueller-Klieser, K. Renner, M. Kreutz, LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells, *Cell metabolism* (2016).

- [80] F. Yao, T. Zhao, C. Zhong, J. Zhu, H. Zhao, LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma, *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (2013) 25–31.
- [81] C. Seliger, P. Leukel, S. Moeckel, B. Jachnik, C. Lottaz, M. Kreutz, A. Brawanski, M. Proescholdt, U. Bogdahn, A.-K. Bosserhoff, A. Vollmann-Zwerenz, P. Hau, Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)-beta2 and migration of glioma cells in vitro, *PLoS ONE* 8 (2013) e78935.
- [82] R. Stern, *Hyaluronan in cancer biology*, 1st ed., Academic Press, San Diego, CA, 2009.
- [83] S.L. Sheng, J.J. Liu, Y.H. Dai, X.G. Sun, X.P. Xiong, G. Huang, Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma, *FEBS J.* 279 (2012) 3898–3910.

9. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2012 bis Juni 2017 unter Anregung, Betreuung und Anleitung von Frau Prof. Dr. Marina Kreutz am Lehrstuhl für Innere Medizin III in der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie angefertigt. Ich möchte mich bei Ihr als Leiterin der Arbeitsgruppe ich als Erstes bedanken: Dafür, dass mir die Durchführung der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe ermöglicht wurde, für die vielen inhaltlichen Ideen und Inputs, Erklärungen, die bereichernden Besprechungen und die generelle vielgestaltige Unterstützung natürlich auch durch die Korrektur der Arbeit. Bei Dr. rer. nat. Katrin Singer möchte ich mich für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken, für die inhaltliche und methodische Mithilfe, Überwachung und Korrektur. Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg danke ich für das erhaltene Promotionsstipendium. Herrn Prof. Dr. R. Andreesen und Prof. W. Herr als ehemaligen bzw. aktuellen Leiter der Klinik für Innere Medizin III am Universitätsklinik Regensburg möchte ich danken, dass ich die Doktorarbeit an Ihrer Klinik durchführen durfte. Almut Brand arbeitete mich gewissenhaft ein und war durch unsere eng vernetzten Themengebiete und ihre ständige Bereitschaft, alle meine Fragen zu beantworten sowie ihre vielen Vorarbeiten zum Thema eine sehr grosse Unterstützung. Gabriele Schönhammer war eine unentbehrliche und unermüdliche Stütze beim präzisen Erlernen der vielgestaltigen Methoden und beim Durchführen der Experimente. Monika Wehrstein, Stephanie Färber und Alice Peuker danke ich ebenfalls für die tatkräftige Unterstützung bei diversen Experimenten. Dr. Katrin Renner-Sattler möchte ich danken für viele Hilfestellungen methodischer und inhaltlicher und motivationstechnischer Art. Anton Seilbeck und Matthias Fante, meinen beiden Medizindoktoranden-Mitstreitern möchte ich für die vielen ergiebigen Gespräche, die gute Laune und die gegenseitige moralische Unterstützung im Labor danken. Meine Freunde und Familie haben mich motiviert, am Ball zu bleiben, Interesse und viel Verständnis gezeigt, danke dafür!

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stans, Schweiz, den

Marlene Kolitzus